



ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE PROTEINES ET LESIONS DE L'ADN PAR RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE PAR IMAGERIE (SPRI)

Christelle Corne

► To cite this version:

Christelle Corne. ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE PROTEINES ET LESIONS DE L'ADN PAR RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE PAR IMAGERIE (SPRI). Autre. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. NNT : . tel-00505298

HAL Id: tel-00505298

<https://theses.hal.science/tel-00505298>

Submitted on 23 Jul 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Grenoble I
Ecole Doctorale Chimie, Science du Vivant

THESE
Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE
Spécialité : Chimie Biologie

Présentée par
Christelle CORNE
Née VIEILLE le 23 Avril 1972 à Besançon (25)

**Etude des interactions
entre protéines et lésions de l'ADN
par Résonance Plasmonique de Surface par imagerie (SPRi)**

Date de soutenance : 13 Juillet 2010

Jury

Président :	Pr SAVASTA Marc
Rapporteurs :	Pr BONNEFONT-ROUSSELOT Dominique Pr GEFFROY-CILLARD Josiane Pr RAYNAUD DE MAUVERGER Eric
Examineurs :	Pr FAVIER Alain Dr GASPARUTTO Didier

Thèse dirigée par Mr FAVIER et codirigée par Mr GASPARUTTO

Thèse préparée au sein du laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques
LCIB (UMR-E 3 CEA-UJF)/INAC/FRE CNRS 3200
Commissariat à l'Energie Atomique de Grenoble

Merci...

Je tiens à remercier chaleureusement les membres du jury de cette thèse et en particulier Mme le Professeur Bonnefont-Rousselot, Mme le Professeur Geffroy-Cillard, Mr le Professeur Raynaud de Mauverger, d'avoir accepté de juger ce travail malgré les contraintes temporelles. J'adresse également mes sincères remerciements à Mr le Professeur Alain Favier qui a été témoin de l'histoire de ce travail, toujours en arrière plan des missions hospitalières nombreuses et passionnantes. Cette étude n'aurait pas été possible sans l'implication de Mr le Dr Didier Gasparutto qui a été à la source des éléments nécessaires à l'utilisation de notre biopuce, des oligonucléotides de synthèse aux protéines enzymatiques purifiées. Enfin et surtout, je suis infiniment reconnaissante envers Mr le Professeur Savasta, auteur d'un certain appel téléphonique au mois de février dernier et sans lequel ma décision de démission était entérinée.

L'ensemble du travail présenté ici est le résultat d'une collaboration remarquable avec deux physiciens de haut niveau, Mme Julia Fuchs et Mr Jean-Bernard Fiche. Ils m'ont conduite à l'intersection du monde de la physique et du monde de la biologie, et ce voyage enrichissant est parfois périlleux mais jamais monotone. Nous avons construit simultanément des puces SPR robustes et une solide amitié. Merci à eux pour leur disponibilité, leur soutien et leur sourire.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers l'équipe du laboratoire CREAB et en particulier les Drs Livache, Calemczuk et Buhot qui ont encadré ce travail et trouvé des réponses simples à des questions compliquées.

Octobre 2003/Juillet 2010, presque 7 ans de travail en pointillés. De nombreuses directions, de nombreux virages, de nombreux demi-tours. Un labyrinthe compliqué. Un tunnel sans lumière.

Je remercie tous ceux qui m'ont soutenue et aidée au quotidien ; ils se reconnaîtront.

Je remercie mes parents d'avoir été là quand il le fallait, comme toujours.

Je remercie Léo et Tina de leur soutien inconditionnel au cours de cette période difficile. C'est bientôt fini Maman...

A mon mari, cette thèse est également la sienne.

SOMMAIRE

Sommaire	1
Abréviations	5
Introduction	7
CHAPITRE I.....	9
Les lésions de l'ADN et leur réparation.....	9
I Structure de l'ADN	9
II Nature et origine des lésions de l'ADN	11
II.1 Les lésions oxydatives.....	11
II.2 Les désaminations et la formation de sites abasiques	14
II.3 Les lésions par formation d'adduits	14
II.4 Les lésions photochimiques	15
II.5 Les lésions multiples	15
III Les grands mécanismes de réparation.....	17
III.1 La suppression des nucléotides triphosphates anormaux.....	19
III.2 La réversion directe des dommages	19
III.3 La recombinaison	20
III.3.1 Réparation par recombinaison homologue.....	20
III.3.2 Réparation par recombinaison non homologue.....	21
III.4 La réparation par excision de base (BER).....	22
III.4.1 Mécanisme.....	22
III.4.2 Types de glycosylases impliquées dans la BER.....	24
III.4.3 Les enzymes de la BER chez les bactéries	26
III.4.3.1 Fpg protéine (Fapy-glycosylase ou Mut M).....	26
a) Description de la Fpg	27
b) Reconnaissance des lésions	27
c) Activité enzymatique de la Fpg	27
III.4.3.2 Endonucléase III.....	28
III.4.3.3 Endonucléase IV.....	29
III.4.3.4 Endonucléase VIII.....	29
III.4.4 Les enzymes de la BER eucaryotes.....	29
III.4.4.1 Les enzymes OGG.....	29
III.4.4.2 Uracile ADN N-Glycosylase (UNG)	30
III.4.4.3 Ape1, ou HAP1, Ref-1, APEX-1.....	31
III.5 La réparation par excision de nucléotides (NER)	31

III.6	La réparation des mésappariements	34
III.7	La réparation des lésions multiples	35
III.7.1	Cas des lésions sur brins opposés	36
III.7.2	Cas des lésions sur le même brin (lésions tandem)	37
IV	Fonctionnement des systèmes de réparation	38
IV.1	Déclenchement de la réparation et kinases	38
IV.2	Expression des gènes de réparation et adaptation au stress	38
IV.3	Adaptation par translocation nucléaire.....	39
IV.4	Variations physiologiques.....	40
V	Conséquences des lésions pour les êtres vivants.....	41
V.1	Mutations et évolutions	41
V.2	Apoptose	41
V.3	Carcinogenèse	42
V.3.1	Maladies héréditaires	42
V.3.2	Maladies acquises	43
V.3.3	Thérapeutique	44
V.4	Sénescence	45
CHAPITRE II :		46
Méthodes d'étude des interactions ADN/protéines.....		46
I	Etude <i>in vivo</i> des lésions ou de la réparation de l'ADN	47
I.1	Des méthodes indirectes.....	47
I.2	Des méthodes directes.....	47
II	Etude <i>in vitro</i> des protéines de reconnaissance et de réparation de l'ADN.....	48
II.1	Techniques avec marquage	50
II.1.1	Radioactivité	50
II.1.1.1	Filtration sur membrane.....	50
II.1.1.2	Gel shift : EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay	50
II.1.1.3	Analyse des coupures par électrophorèse	51
II.1.1.4	Mesure du blocage de la réplication par une lésion (extension d'amorce)	53
II.1.1.5	Mesure des mutations	53
II.1.1.6	Crosslinking induit.....	53
II.1.1.7	Universal Protein Array (UPA)	54
II.1.1.8	Southwestern Blotting.....	54
II.1.2	Fluorescence	55
II.1.2.1	Biopuces.....	55
II.1.2.2	Spectroscopie par fluorescence.....	56

II.1.2.3	FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer	56
II.1.3	Marquage photo-chimique	57
II.2	Techniques de « Binding »	58
II.2.1	Immunoprécipitation	58
II.2.2	Tag des protéines avec une séquence poly-histidine	58
II.2.3	Billes magnétiques	58
II.2.3.1	Billes fixées à des oligonucléotides dans le but de piéger une ou plusieurs protéines d'intérêt	58
II.2.3.2	Cas particulier d'utilisation des billes : purification du complexe ADN/protéine	60
a)	Le test de trapping	60
b)	Oligonucléotide conjugué à une molécule photo-réactive	61
II.3	Techniques de Footprinting	62
II.4	Protéomique	64
II.4.1	Electrophorèse bidimensionnelle	64
Cas particulier :	Technique DIGE : Difference Gel Electrophoresis	66
II.4.2	Surface Enhanced Laser Desorption Ionization : SELDI	66
II.5	Méthodes optiques	68
II.5.1	Spectrophotométrie en flux stoppé	68
II.5.2	Résonance Plasmonique de Surface : SPR	68
II.6	Spectrométrie de masse	69
II.6.1	Utilisée de manière indépendante	69
II.6.2	Utilisée de manière couplée à une autre technologie	70
II.6.2.1	Premier cas : analyse directe sur le prisme	72
II.6.2.2	Deuxième cas : analyse après élution	72
II.6.2.3	Troisième cas : séquençage par spectrométrie de masse en tandem	73
CHAPITRE III	74
Principe SPRi et Résultats	74
I	Principe	75
II	Dispositif	76
II.1	Système optique	76
II.2	Surface métallique	77
II.3	Sensorgramme	79
II.4	Avantages de cette technique	80
III	Contexte de son utilisation	81
IV	Description de notre dispositif	83
IV.1	Les zips et leur hybridation (construction du ligand)	83

a) Substitution possible par une base oxydée.....	85
b) Substitution possible par une base cyclisée	86
c) Substitution possible par un analogue de site abasique	86
d) Lésions tandem	87
IV.2 Le tampon.....	89
IV.3 Le blocage de la surface	90
V Etude des enzymes de réparation	92
V.1 Les protéines analysées	92
V.2 La régénération.....	93
V.3 Analyse de la liaison ADN/enzyme	93
V.4 Révélation de l'activité enzymatique	95
V.4.1 Première approche : deux injections consécutives d'enzyme.....	95
V.4.2 Deuxième approche : révélation par la température	96
V.4.3 Troisième approche : réaction de trapping avec le borohydrure de sodium	98
V.5 Amplification possible du signal.....	100
V.5.1 Signal de fixation de la protéine à l'oligonucléotide	100
V.5.2 Signal de révélation de l'activité après dissociation thermique..	100
V.6 Identification des protéines fixées.....	101
VI Discussion sur les résultats obtenus vis-à-vis des différentes lésions.....	103
VI.1 Dans le cas d'un site lésé unique.....	103
VI.2 Dans le cas de lésions tandem.....	105
VI.2.1 Etude de Fpg.....	106
VI.2.1.1 Interprétation du signal d'injection de Fpg	107
VI.2.1.2 Interprétation du signal d'hybridation.....	108
VI.2.2 Etude de EndoIV	108
VI.2.3 Etude de OGG1	110
VI.2.4 Etude de l'action couplée de 2 enzymes	111
VII Perspectives	113
Conclusion	114
Références	115
Liste des Figures	135
Liste des Tableaux.....	137
Publication numéro 1	138
Publication numéro 2	148

ABRÉVIATIONS

8-oxoA	7,8-dihydro-8-oxoadénine
8-oxoG	7,8-dihydro-8-oxoguanine
A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
AGT	alkylguanine-transférase
AP	apurinic/aprimidic ; site abasique
Ape1	Human apurinic/aprimidic endonuclease 1 (Ref-1)
ARN	acide ribonucléique
ATM	ataxia telangiectasia mutated protein
ATP	Adenosine Tri Phosphate
BER	Base excision repair
BSA	bovine serum albumin
C	cytosine
C3	homologue synthétique d'un site abasique
CA	5',8-cyclo-2'-déoxyadénosine
CAF	chromatin assembly factor
DIGE	Difference Gel Electrophoresis
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine tetracetic acid
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
EndoIV	endonucléase IV
ERCC1	excision repair cross-complementing 1
FapyG	2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine
FEN1	flap endonuclease 1
Fpg	formamidopyrimidine DNA glycosylase ou MutM
FRET	fluorescence resonance energy transfer
G	guanine
GFP	Green Fluorescent Protein
GGR	global genome repair
GTP	Guanosine Tri Phosphate
HPLC	high performance liquid chromatography
LP-BER	long-patch BER
MALDI TOF	matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight
MBD4	methyl-CpG binding domain protein 4
MPG	méthylpurine-DNA glycosylase
MR	Mismatch Repair
MTH1	Human MutT homologue
MUTYH	homologue de MutY
NEIL	nei endonucléase VIII-like
NER	Nucleotide excision repair
NHEJ	non homologous end joining
NTHL1	nth endonucléase III-like 1
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis

PBS	phosphate buffer saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PEEK	polyetheretherketone
R23	hHR23B, protéine de la NER, human homolog Rad23 B
Ref-1	Redox factor-1 ou Ape1
RFC	replication factor C
RPA	replication protein A
SA	streptavidine
SELDI	Surface Enhanced Laser Desorption Ionization
SMUG1	single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase
SN-BER	single nucleotide BER
SPR	surface plasmon resonance
SPRi	surface plasmon resonance imaging
T	thymine
TCR	transcription coupled repair
TDG	thymine-DNA glycosylase
TEG	triethyleneglycol
TEL	transfert d'énergie linéique
TFIIH	transcription factor IIH
THF	tetrahydrofurane
U	uracile
UNG	uracile DNA N-glycosylase
UPA	Universal Protein Array
UV-DDB	UV damaged DNA binding protein complex
XP (A, B, ...)	protéines de réparation, XP signifiant Xeroderma Pigmentosum
XRCC1	X-ray repair complementing defective repair
Zip	séquence oligonucléotidique utilisée pour les puces universelles
Zipc	Zip complémentaire

INTRODUCTION

Les biotechnologies permettent à présent le développement d'outils particulièrement utiles en biologie et en médecine ; les biopuces constituent une illustration de ce potentiel. Dans le domaine de l'oncologie, les lésions de l'ADN et leur réparation jouent un rôle essentiel et dans cette problématique, les puces à ADN permettent une meilleure compréhension des mécanismes de reconnaissance ADN/protéine.

Notre objectif était d'identifier par la protéomique les protéines reconnaissant les lésions carcinogènes des acides nucléiques. L'identification de ces protéines d'intérêt pourrait permettre de définir de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouvelles applications médicales.

Le protéome peut être défini comme l'ensemble des protéines synthétisées par une cellule. La protéomique nous permet l'analyse de l'ensemble des protéines d'un échantillon biologique donné, dans une situation physiologique ou pathologique. Le résultat obtenu est un profil protéique avec, dans la mesure du possible, l'identification des protéines d'intérêt.

Depuis quelques années, les outils de protéomique sont de plus en plus performants et nous donnent accès à des informations sur des protéines contenues dans des mélanges complexes. Mais les technologies nécessaires sont très coûteuses. Le CHU de Grenoble et l'Université Joseph Fourier ont décidé la création d'un Centre d'Investigation Biologique (CIB) dans lequel une plateforme de protéomique s'est développée depuis 2002 ; elle dispose à présent des équipements permettant des analyses complètes, de la séparation des protéines (gels bidimensionnels, HPLC, SELDI) à leur identification (Maldi-Tof).

Notre projet initial était d'identifier des protéines d'intérêt impliquées dans la reconnaissance ou la réparation des lésions de l'ADN. Nous avons envisagé cette étude au sein de mélanges complexes comme les extraits cellulaires obtenus à partir de cellules saines ou tumorales. Cette approche a été tentée à l'aide d'outils comme l'électrophorèse bidimensionnelle, les billes magnétiques ou la technologie SELDI mais n'a pas donné de résultats concluants.

Nous nous sommes alors intéressés à la résonance plasmonique de surface par imagerie (SPRi) offrant la possibilité d'analyser plusieurs interactions moléculaires en continu et simultanément.

Durant ce travail, nous avons réuni les compétences de deux laboratoires différents et nous disposons d'une part d'un système miniaturisé permettant le greffage d'oligonucléotides (laboratoire CREAB) et d'autre part d'une synthèse possible d'oligonucléotides comportant une ou plusieurs bases modifiées (laboratoire LAN).

- Au sein du laboratoire CREAB, la technologie de résonance plasmonique de surface par imagerie est très utilisée pour étudier des interactions moléculaires très variées, en temps réel et sans nécessité de marquage.
- Le laboratoire LAN possède une compétence reconnue pour synthétiser des oligonucléotides modifiés comportant des lésions chimiquement définies.

Nous avons choisi d'étudier le comportement de protéines purifiées (ADN N-glycosylases et AP-endonucléases) impliquées dans la reconnaissance des bases oxydées, alkylées, hydrolysées ou fragmentées et leur excision éventuelle (réparation par excision de bases

BER). Nous avons utilisé des oligonucléotides comportant la lésion 8-oxoguanine qui est la base oxydée la plus étudiée et dont les interactions avec certaines protéines de réparation sont bien connues. La technique de SPRi nous a permis une étude de ces interactions en temps réel.

Ce manuscrit se compose de trois grandes parties :

Au cours d'une courte synthèse bibliographique sur les lésions de l'ADN dans le premier chapitre, nous évoquerons les principaux mécanismes de réparation en insistant particulièrement sur la voie de la réparation par excision de bases (BER). Notre technologie de SPRi doit être replacée dans le contexte de l'ensemble des techniques à notre disposition pour ce type d'étude et c'est ce que nous ferons au cours du deuxième chapitre. Le troisième et dernier chapitre sera consacré aux différents résultats obtenus.

CHAPITRE I

LES LESIONS DE L'ADN ET LEUR REPARATION

L'acide désoxyribonucléique, ou ADN, est une extraordinaire molécule qui garde en mémoire et transmet les caractéristiques de tous les êtres vivants. Cette molécule doit donc posséder des propriétés physicochimiques qui peuvent sembler contradictoires : être d'une stabilité extraordinaire mais être en même temps capable de modifications qui sont à la base de l'adaptation et de l'évolution des espèces vivantes. La stabilité du message génétique est prodigieuse quand on songe que pour un seul être vivant, à partir d'une cellule, l'œuf fécondé, la même molécule d'ADN va être reproduite à l'identique, dans chacune des milliards de cellules composant l'individu et durant toute sa vie pour les milliards de cellules à renouvellement parfois rapide comme nos lymphocytes.

Paradoxalement cette molécule est chimiquement fragile et la fidélité du message sera assurée par une très efficace vérification. Ce sont les très rares erreurs dans cette réparation qui seront à l'origine des modifications infimes aboutissant aussi bien à des mécanismes bénéfiques permettant à la vie d'évoluer qu'à des conséquences létales ou pathogènes comme les cancers.

I STRUCTURE DE L'ADN

Macromolécule polymère formée de deux brins oligonucléotidiques antiparallèles, l'ADN possède une stabilité due en partie aux liaisons hydrogène se formant entre bases complémentaires. Chacun des nucléotides est composé d'un sucre (le 2-désoxyribose) lui-même relié par une liaison ester à un phosphate et par une liaison *N*-glycosidique à l'une des quatre bases suivantes : Adénine (A) ou Guanine (G) qui constituent les bases puriques, et Thymine (T) ou Cytosine (C) qui constituent les bases pyrimidiques. Les phosphates relient les nucléotides entre eux par une liaison ester entre l'hydroxyle 3' de l'un et l'hydroxyle 5' du suivant. De par cette propriété physico-chimique, l'ADN peut être dupliqué par la cellule, chaque brin servant de matrice.

C'est la séquence des bases mises dans un ordre précis qui constitue le message génétique car une succession de trois bases définira la position d'un acide aminé précis lors de la synthèse des protéines.

La structure de base de l'ADN est représentée sur la figure 1.

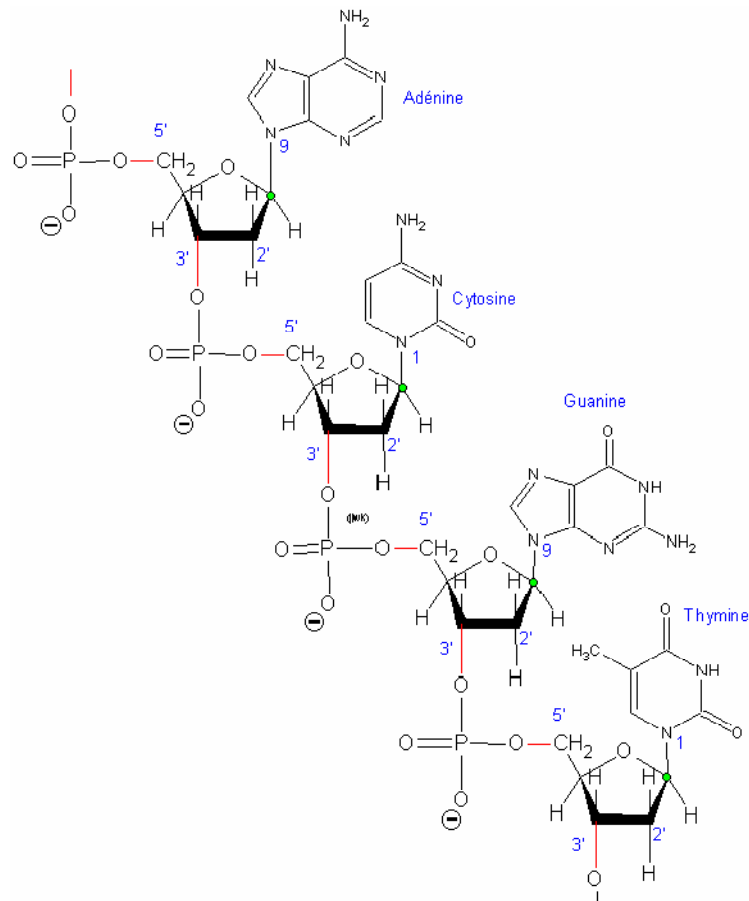


Figure 1 : Structure de la molécule d'ADN

La découverte fondamentale de Watson et Crick est que l'ADN est formé de deux de ces polymères mis face à face dans une structure en double hélice, le sens de polymérisation d'un brin étant inverse de celui du brin qui lui est associé, leurs bases étant dans une complémentarité précise. La guanine est toujours associée à la cytosine, et l'adénine à la thymine par des liaisons hydrogène.

La taille de ce polymère nucléaire est considérable puisque les 46 chaînes (une par chromosome) mises bout à bout représentent 12 milliards de nucléotides et une longueur de 1 mètre. Cette molécule des milliers de fois plus longue que la cellule qui la contient est soigneusement enroulée autour de nucléosomes formés de protéines spécifiques, les histones. Cette structure ordonnée forme la chromatine et permet un accès rapide aux zones devant soit être copiées en ARN pour la synthèse protéique soit réparées. Nos cellules contiennent aussi de petites boucles d'ADN circulaire de seulement 16569 paires de bases dans nos mitochondries.

Les bactéries contiennent aussi des ADN de plus petite taille, de quelques millions de nucléotides, non entourés d'histones et généralement circulaires, ainsi que de petites boucles d'ADN, les plasmides.

II NATURE ET ORIGINE DES LÉSIONS DE L'ADN

Chaque jour l'ADN d'une cellule subit en moyenne 40 000 dommages sur ses bases, qui heureusement vont être correctement réparés.

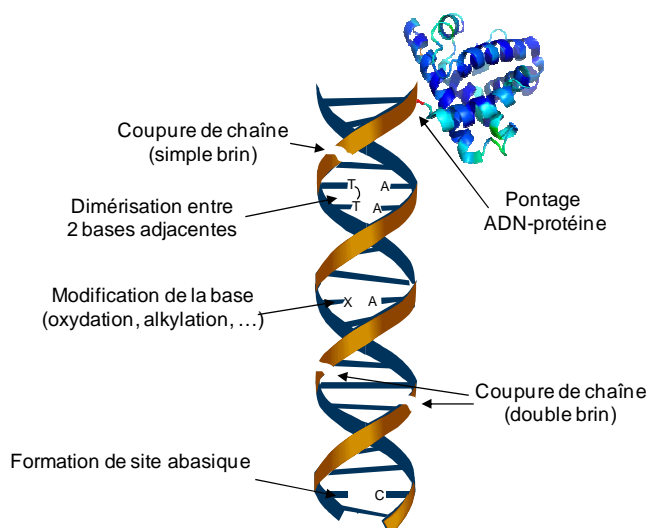


Figure 2 : Représentation schématique des différentes lésions de l'ADN

L'ADN cellulaire souffre de l'attaque d'agents exogènes et endogènes, générant une large variété de modifications impliquées dans la mutagenèse et la carcinogénèse. Notre ADN est en effet sous l'agression constante de la lumière solaire, de l'oxygène, d'agents chimiques et même de nos propres processus cellulaires.

Les lésions de l'ADN peuvent être de différentes natures :

Tableau I : Différentes lésions de l'ADN

Stress	Conséquences sur l'ADN
Rayons ultra-violets	Domage de base
H ₂ O ₂	Cassure simple brin
Cis-Platine	Adduits
Rayons X	Cassures simple et double brin et domage de base

D'après Lindahl^[1]

II.1 Les lésions oxydatives

De nombreuses espèces réactives de l'oxygène sont capables de modifier les macromolécules cellulaires, protéines, lipides, et aussi l'ADN. Selon le mécanisme, les bases puriques et pyrimidiques peuvent être transformées en produits d'oxydation, ou subir des ouvertures de cycle pour aboutir à des dérivés comme la formamido pyrimidine^[2].

Mais le radical hydroxyle peut aussi attaquer directement soit la liaison entre la base et le sucre créant des sites abasiques, soit la molécule de désoxyribose créant des coupures de chaîne ^[3].

Un très grand nombre de ces dérivés ont ainsi été identifiés et certains d'entre eux sont représentés sur la figure ci-dessous :

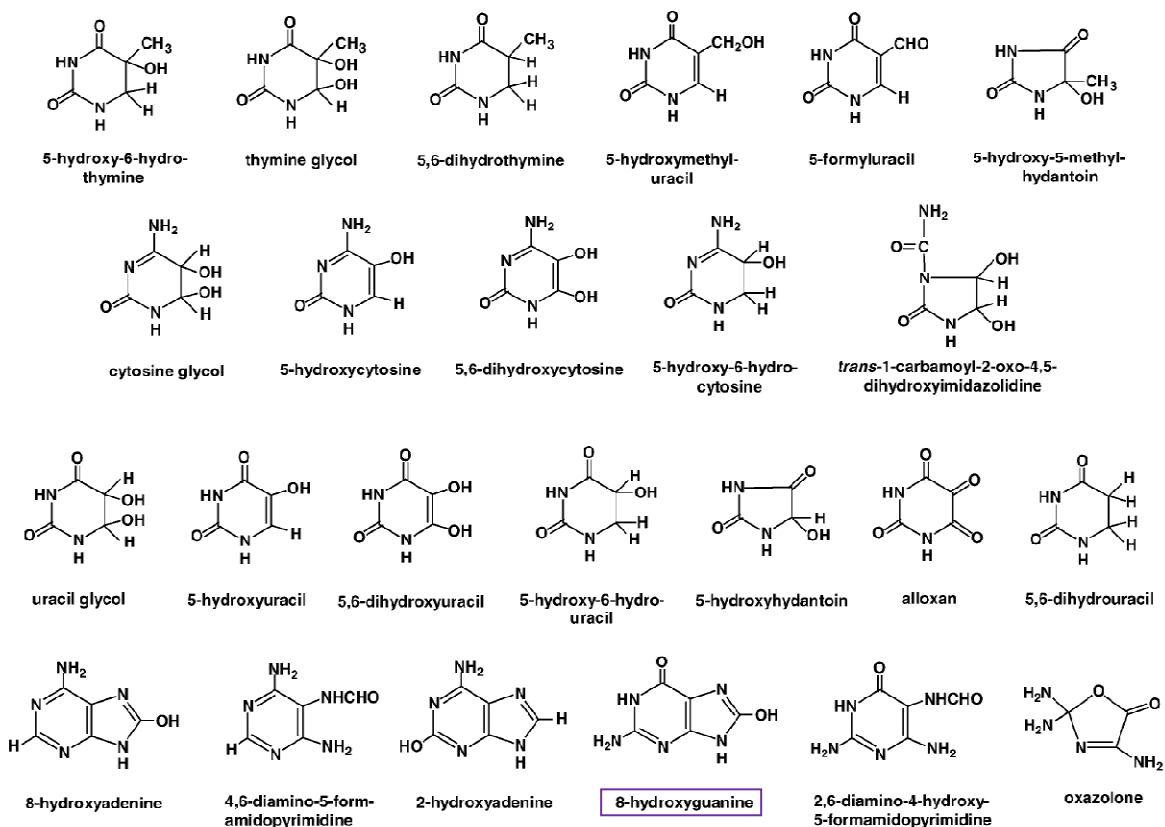


Figure 3 : Exemples de lésions oxydatives des bases de l'ADN

D'après ^[4]

Les molécules H_2O_2 et O_2^{\bullet} ne sont pas très réactives pour altérer fortement l'ADN, mais elles peuvent toutes deux générer le radical $\bullet OH$ qui est l'espèce la plus réactive de l'oxygène. Ces espèces sont normalement sous contrôle de tout un ensemble de systèmes antioxydants nutritionnels (vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols), de piègeurs endogènes (glutathion, thioredoxine, glutaredoxine) ou d'enzymes antioxydantes (superoxydes dismutases, catalases, glutathion peroxydases, thioredoxine peroxydases). Ces espèces réactives de l'oxygène, lorsqu'elles sont contrôlées, sont utilisées par l'organisme comme médiateurs cellulaires ou comme agents de destruction de bactéries ou de cellules anormales. En revanche, lorsque la surproduction déborde les systèmes antioxydants, le tissu ou l'organisme se trouve en état de stress oxydant ^[4]. En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, détresse respiratoire aigue, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré. Ainsi, les relations entre stress oxydant et cancer s'avèrent très étroites, les radicaux libres intervenant dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, créant les lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant des gènes suppresseurs de tumeur comme P53.

Les dommages oxydatifs de l'ADN cellulaire sont estimés à 0,5 fmol à 1 pmol/ μg d'ADN à l'état basal ; c'est la cause la plus importante de mutations spontanées chez l'homme ^[5].

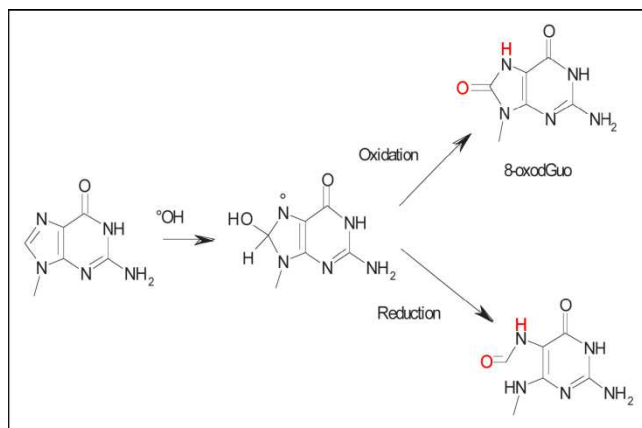


Figure 4 : Formation d'une base 8-oxoG ou FapyG par attaque d'espèces réactives de l'oxygène (radical hydroxyle) sur la guanine
D'après Blainey^[6] et Cadet^[2]

Parmi les lésions oxydatives, les modifications de base constituent la majorité des dommages, dont la plus étudiée est la 7,8-dihydro-8-oxoguanine (identifiée sous le terme 8-oxoG dans la suite de ce document).

C'est ce premier groupe que nous allons étudier en résonance plasmonique de surface en prenant comme « prototype » la base 8-oxoG ; il s'agit de la lésion la plus répandue avec les sites abasiques, impliquée dans les phénomènes de mutagenèse, carcinogénèse et vieillissement^[7].

Elle est incorporée dans l'ADN selon deux voies, soit l'attaque des espèces réactives de l'oxygène sur l'ADN, soit l'oxydation du GTP avant son incorporation par une ADN polymérase^[8]. Son taux de production endogène a été estimé entre 1 et 10 pour 10^6 Guanines^[9]. On sait aujourd'hui que 100 à 500 8-oxoG sont formées par jour dans une cellule humaine^[10]. Elle est considérée comme la lésion **prémutoagène** endogène la plus abondante dans l'ADN^[11] car elle peut induire un désappariement avec l'adénine durant la réplication^[12]. En effet, si cette lésion persiste, le couple 8-oxoG/A est converti en T/A durant la réplication et cette mutation est fréquemment rencontrée dans les cancers humains.

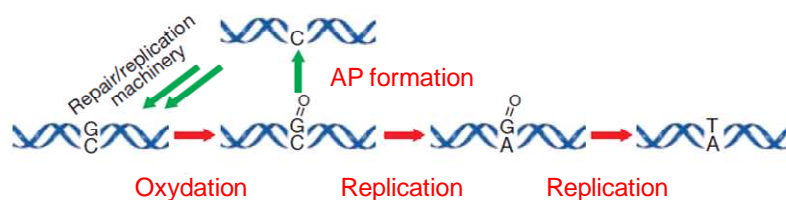


Figure 5 : Réparation de la base 8-oxoG

L'oxydation d'une base guanine génère une base 8-oxoG opposée à une cytosine. Une glycosylase reconnaît la lésion et l'excise, générant un site abasique, restauré en guanine par un mécanisme de réparation. Mais si le brin lésé est répliqué, la 8-oxoG s'hybride avec une adénine. Le résultat est une mutation GC→TA. D'après^[13].

II.2 Les désaminations et la formation de sites abasiques

➤ Les bases puriques et pyrimidiques possèdent une certaine instabilité chimique. En effet, si la liaison phosphodiester est très résistante dans l'ADN par comparaison avec celle de l'ARN, la liaison *N*-glycosidique des bases de l'ADN est plus fragile. Une conséquence possible sera alors l'hydrolyse des bases de l'ADN (dépurination, dépyrimidination) conduisant à la formation de sites abasiques^[14]. Ces sites abasiques sont intrinsèquement instables et peuvent entraîner des ruptures de chaîne dans la double hélice de l'ADN sous l'action de la chaleur, de produits chimiques basiques, ou des ions Mg^{2+} . Ces sites sont donc fortement mutagènes *in vivo*^[15].

Ils sont formés par perte spontanée de bases, résultat de l'action d'agents alkylants ou par l'action des glycosylases. Ce sont les lésions les plus fréquentes de l'ADN car on estime qu'il existe 50 000 à 200 000 sites par cellule à l'état basal^[16] et que 10 000 sites sont créés par jour dans chaque cellule humaine^[17]. Si ils ne sont pas réparés, ils représentent des sites potentiels pour des mutations. Il s'agit de la règle du A (insertion préférentielle d'une adénine).

De plus, ces lésions sont dangereuses car elles bloquent la réplication de l'ADN avec des conséquences cytotoxiques^[16].

➤ Par ailleurs, les bases qui possèdent des amines exocycliques (Adénine, Guanine et Cytosine) peuvent être désaminées à température et pH physiologiques^[18]. La guanine et l'adénine se désaminent pour former respectivement la xanthine et l'hypoxanthine. La désamination de la cytosine explique la présence anormale d'uracile dans l'ADN. La structure en double brin assure à l'ADN une protection relative face aux réactions de désamination. Ces dernières sont facilitées lorsque l'ADN est sous forme simple brin.

II.3 Les lésions par formation d'adduits

De nombreux produits chimiques vont pouvoir gagner le noyau cellulaire et se fixer par une liaison covalente sur une des bases de l'ADN, le plus souvent la guanine. L'alkylation de l'ADN a généralement lieu sur les positions N-7 et O-6 de la guanine et N-3 de l'adénine. Certains réactifs possèdent deux sites électrophiles et sont ainsi capables de former deux liaisons avec l'ADN, ce qui conduit à des pontages intra-brins ou inter-brins.

Cet effet est souvent le fait de produits toxiques polluant l'environnement dont les plus connus sont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dont fait partie notamment le benzo[a]pyrène. Cette famille de composés génotoxiques est largement présente dans la fumée de tabac mais aussi dans l'alimentation (aliments fumés ou grillés), la pollution atmosphérique (gaz d'échappement) ou les émissions industrielles.

Des adduits peuvent également être formés à partir des produits endogènes issus des métabolismes cellulaires, dont les dérivés de l'oxydation des lipides, notamment les aldéhydes comme le 4-hydroxy-nonén-2-al, ou les dérivés chlorés issus de l'inflammation. L'addition d'aldéhydes aboutira à la formation d'éthénoadduits ou, lorsqu'il s'agit de bis-aldéhydes comme le malonaldéhyde, à la formation d'un nouveau cycle sur la guanine. Des produits d'oxydation du glucose, comme le glyoxal et le méthylglyoxal sont fréquemment induits par le stress oxydant chez le diabétique^[19]. Les protéines ou polyamines entourant l'ADN peuvent aussi former de tels adduits en cas d'attaque radicalaire.

Inversement ces propriétés sont exploitées dans la lutte contre le cancer dans la réalisation de médicaments alkylants qui en se fixant sur l'ADN entraîneront la mort par apoptose des cellules cancéreuses. Il s'agit par exemple du cis-platine, des dérivés de la nitroso-urée ou de la mitomycine C.

II.4 Les lésions photochimiques

Les rayonnements ultraviolets (UV) vont selon leur longueur d'onde réaliser des réactions photochimiques directes sur les bases de l'ADN aboutissant à la formation de dommages particuliers, les photoproduits. Le maximum d'absorption de l'ADN étant à 260 nm, le rayonnement UVB dont la longueur d'onde est comprise entre 285 et 315 nm a un effet direct sur la molécule d'ADN. Ce sont les bases pyrimidiniques qui vont pouvoir réagir avec ces photons pour former des dimères cyclobutanes ou des photoproduits (6-4) au niveau de deux bases pyrimidiniques adjacentes ^[20].

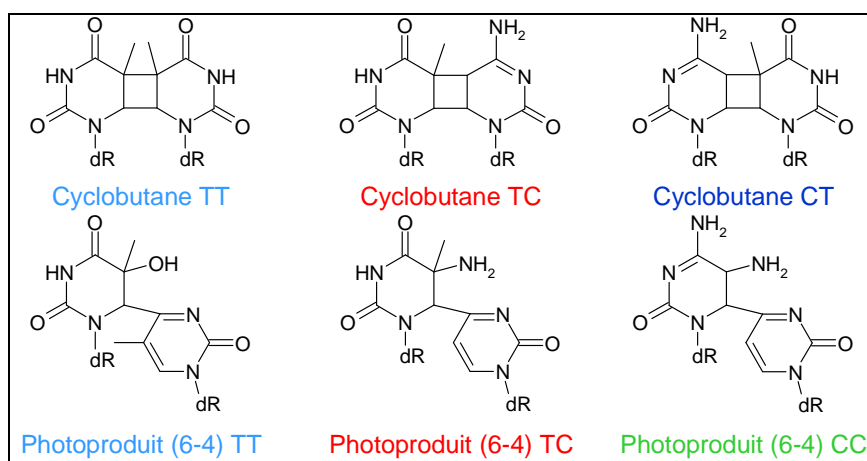


Figure 6 : Exemples de lésions photochimiques sur des bases pyrimidiniques

Cette action était jusqu'il y a peu de temps attribuée uniquement aux UVC (présents dans le vide mais pas à la surface de la terre) et aux UVB dont ils expliquaient l'action carcinogène sur la peau. Des travaux récents de Thierry Douki ont montré que les rayonnements UVA formaient eux aussi des quantités non négligeables de photoproduits ^[21].

II.5 Les lésions multiples

Les dommages de l'ADN ne sont pas toujours isolés, mais peuvent se trouver nombreux dans une portion étroite de la molécule (un à deux tours d'hélice), on parle alors de lésions multiples ou de cluster de lésions. La définition de « clustered damage » correspond minimum à deux dommages produits sur une longueur de 10 paires de bases ^[22]. Lorsque deux lésions sont sur le même brin d'ADN, il s'agit de lésions « tandem ».

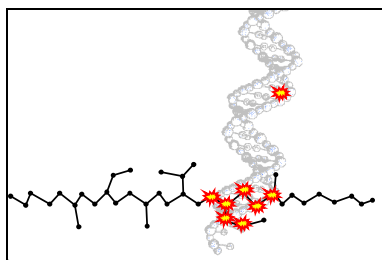


Figure 7 : Dépôt d'énergie dans l'ADN par un rayonnement ionisant à haut TEL
(ion lourd, particule Alpha), d'après Douki ^[23].

Les rayonnements ionisants forment un grand nombre de ces clusters de lésions. En effet ils agissent dans la cellule surtout indirectement en ionisant la molécule d'eau ce qui conduit à la formation de différentes espèces réactives. Ils vont déposer leur énergie le long de leur trajet à travers l'ADN créant ainsi un grand nombre de cassures doubles et de lésions multiples. Le stress oxydant et certains anticancéreux radiomimétiques comme la bléomycine peuvent aussi générer un certain nombre de lésions multiples. Celles-ci sont très dommageables pour la cellule car beaucoup plus difficiles à réparer comme nous le verrons plus loin.

III LES GRANDS MECANISMES DE REPARATION

La réparation doit être replacée dans son contexte cellulaire ; il s'agit d'une réponse cellulaire possible parmi d'autres, face à une lésion de l'ADN. La conséquence première est un arrêt de la réplication ou de la transcription. La cellule peut s'orienter vers une tolérance de la lésion (mutation avec ou sans conséquence phénotypique). On sait en effet que la grande partie du génome des Mammifères n'est pas transcrite dans chaque cellule et ces régions inactives pourraient tolérer certains dommages. Le déclenchement de l'apoptose est une autre réaction cellulaire possible, en particulier quand la réparation est un échec.

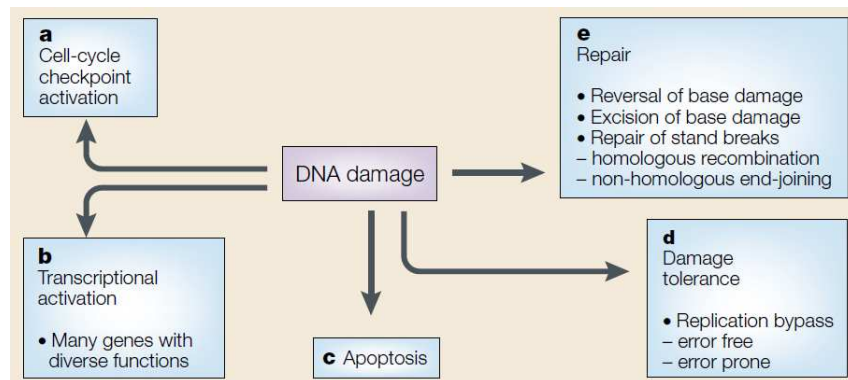


Figure 8 : Les conséquences cellulaires d'une lésion de l'ADN

D'après ^[24].

a : arrêt du cycle cellulaire

b : activation d'un grand nombre de gènes, rôle dans la survie cellulaire ?

c : apoptose, probablement quand les autres réponses ne sont pas suffisamment efficaces

d : tolérance de la lésion (mutation)

e : réparation de l'ADN

Une fraction considérable du génome code des protéines qui recherchent et réparent l'ADN lésé ^[25]. En 2009, plus de 150 gènes associés à la réparation de l'ADN sont identifiés chez l'homme ^[26]. L'importance de la réparation est illustrée par les syndromes de déficience de réparation qui seront abordés ultérieurement.

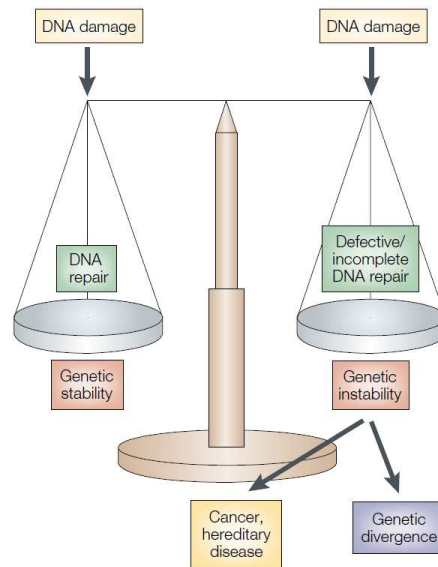


Figure 9 : Schéma illustrant la réponse à une lésion de l'ADN

Equilibre entre réparation et autres réponses cellulaires, provoquant ou non des mutations (instabilité génétique). D'après ^[24].

Les modes de réparation sont bien conservés de la bactérie à l'homme ^[27].

L'ensemble du système de réparation des lésions de l'ADN comprend 6 mécanismes dont les trois principaux sont la réparation par excision de bases (BER), la réparation par excision des nucléotides (NER) et la réparation des mésappariements (MR). Il faut citer ici les trois autres mécanismes que sont la prévention de l'incorporation de nucléotides endommagés, la réversion directe et la recombinaison.

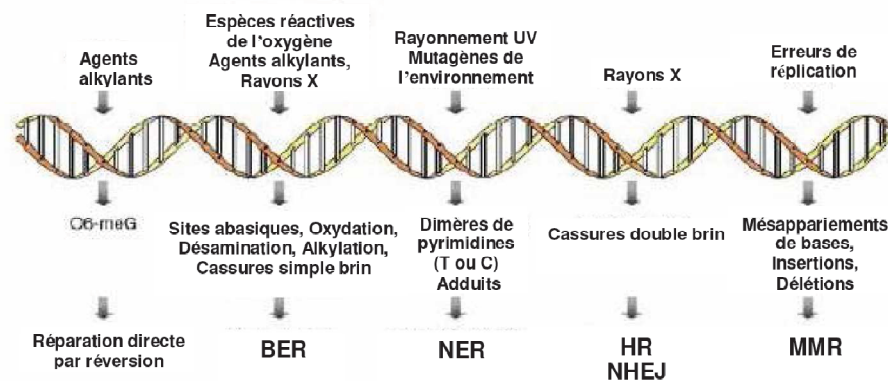


Figure 10 : Les différentes voies de réparation de l'ADN

D'après ^[28]

La reconnaissance des lésions est la première étape de toutes les voies de réparation ^[29].

III.1 La suppression des nucléotides triphosphates anormaux

Il s'agit du système de prévention de l'incorporation des bases oxydées.

Les désoxynucléotides triphosphates libres peuvent s'oxyder puis les bases anormales produites être alors introduites dans l'ADN en cours de sa synthèse.

- ♦ Chez *E. coli*, l'enzyme MutT est chargée d'hydrolyser la molécule de 8-oxodGTP (8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine 5'-triphosphate). Une mutation de cette protéine entraîne un nombre de transversions A.T → C.G 100 à 100000 fois supérieur au taux de l'espèce sauvage ^[30]. L'enzyme humaine appelée MTH1, qui est une 8-oxodGTPase représente également le premier niveau de protection. Ceci permet d'éviter l'incorporation de 8-oxoG lors de la néosynthèse de l'ADN ^[31].
- ♦ Pour éviter l'incorporation d'uracile en cours de synthèse d'ADN, une désoxyuridine triphosphatase (dUTPase) hydrolyse le dUTP formé accidentellement ou provenant d'une désamination du dCTP, régénérant le dUMP utilisable dans la biosynthèse de la thymidine.

III.2 La réversion directe des dommages

Des dommages peuvent être directement supprimés, sans remplacer le nucléotide endommagé par un nouveau.

- L'enzyme AGT (O6-alkylguanine-ADN transférase), aussi nommée O6-méthylguanine-ADN méthyltransférase (MGMT), déméthyle les O-méthyle ou alkyle guanine, ainsi que plus lentement les O4-méthylthymine, dans de nombreuses espèces des bactéries à l'homme ^[27].
- Les bases méthylées sont réparées par le même mécanisme chez les bactéries comme chez l'homme. Les enzymes AlkB chez *E. coli* et hABH 2 et 3 chez l'homme déméthylent les N1-méthyl-adénine et les N3-méthyl-cytosine, par une réaction d'oxydation ^[32].
- Un système enzymatique de photoréversion directe des dimères cyclobutanes par des photolyases utilise l'énergie lumineuse pour couper les liaisons entre les deux bases des dimères de pyrimidine et régénérer deux bases intactes. Ces systèmes ont été identifiés chez les bactéries et chez des eucaryotes primitifs, mais ne semblent pas exister chez l'homme ^[33].
- Nous pouvons citer également l'enzyme polynucléotide ligase qui élimine les cassures simple brin ^[34].

III.3 La recombinaison

Au cours de la vie cellulaire, des cassures de la double hélice d'ADN peuvent survenir. Actuellement, nous connaissons deux systèmes de réparation permettant de corriger ces dommages.

En phases S ou G2 du cycle cellulaire, il s'agit d'une recombinaison de type homologue (HR) qui est impliquée dans la réparation des cassures simples et doubles brins de l'ADN. En revanche, lorsque les cellules se trouvent en phase G1, il s'agit plutôt d'une recombinaison de type non-homologue par jointure des extrémités (NHEJ). NHEJ et HR jouent des rôles superposables dans la réparation des coupures doubles brins dans la phase S du cycle cellulaire.

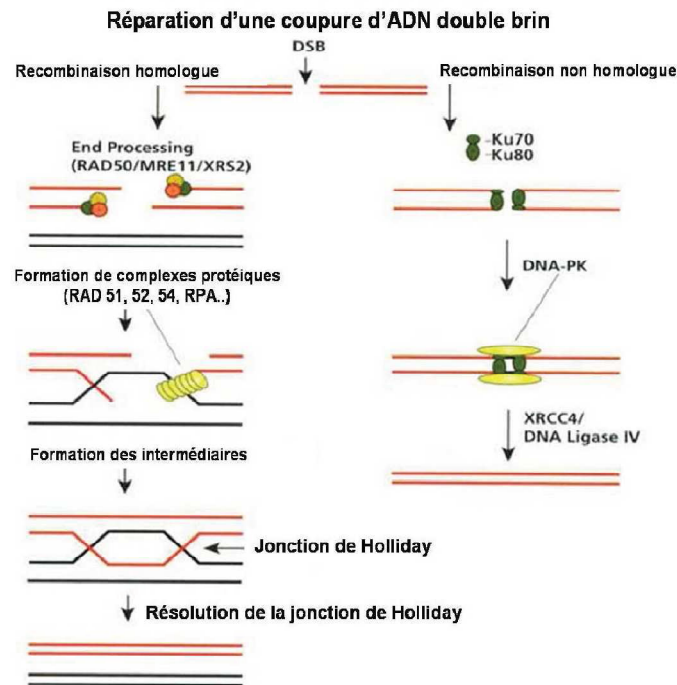


Figure 11 : Recombinaison homologue et non homologue
D'après ^[28].

III.3.1 Réparation par recombinaison homologue

Cette réparation utilise la partie homologue du génome ^[34].

Le mécanisme consiste à éliminer une grande portion de nucléotides autour de la lésion non réparable et à copier la bonne information génétique sur le brin similaire du chromosome apparié. Ceci va nécessiter une machinerie complexe pour rapprocher les deux brins d'ADN de chromosomes différents ^[35].

Elle se décompose en plusieurs étapes successives

1^{ère} étape : la protéine ATM prend en charge la reconnaissance des lésions, active le complexe Rad50/Mre11/Nbs1 et provoque l'apparition d'une extrémité 3' qui sera protégée par la protéine RPA.

2^e étape : BRCA1 active Rad51. La protéine Rad51 (en collaboration avec d'autres protéines : Rad52 et Rad54) est alors chargée de cette extrémité simple brin : Rad51 recherche l'homologie puis elle va positionner un simple brin jugé homologue dans la cassure comme s'il s'agissait d'un ADN simple brin et non plus d'une cassure double brin.

3^e étape : Les dernières étapes de la recombinaison font intervenir plusieurs enzymes : une ADN polymérase qui est chargée de synthétiser le brin complémentaire, une ligase pour souder la liaison phosphodiester et des nucléases pour séparer les deux ADN doubles brins homologues.

La cassure double brin est ainsi réparée. La protéine majeure de cette voie est la protéine Rad51.

Dans les cancers du sein familiaux, soit 5% des cancers du sein, des mutations du gène BRCA1 sont retrouvés ^[36].

III.3.2 Réparation par recombinaison non homologue

La réparation par suture ou jonction des extrémités (Non Homologous End Joining) est aussi utilisée pour la réparation des cassures double brin. Comme précédemment, c'est la protéine ATM qui joue un rôle central en stoppant le cycle cellulaire pour permettre les réactions de réparation ^[37]. Dans le NHEJ les extrémités de l'ADN sont jointes directement. Les principaux composants du NHEJ sont la sous-unité catalytique de la DNA protéine kinase (DNA-PKcs) qui est recrutée par la protéine DNA Ku (hétérodimère), XRCC4 et la DNA ligase IV.

La réparation par le NHEJ n'est toutefois pas une voie de réparation fidèle, puisque des délétions de quelques nucléotides peuvent avoir lieu lors du processus. L'inhibition de NHEJ peut être utilisée comme sensibilisant de la radiothérapie des cancers.

III.4 La réparation par excision de base (BER)

Ce type de réparation corrige les altérations de bases qui ne modifient pas la structure générale de l'hélice ; les modifications concernées sont les oxydations, les déaminations, les ouvertures de cycle et certaines méthylations endogènes. Nous détaillerons davantage ce mécanisme car il est celui étudié dans nos travaux expérimentaux. De plus, la BER est probablement le mécanisme de réparation le plus important quantitativement ^[5]. Dans les cellules humaines, la BER serait impliquée dans la réparation d'environ 20000 lésions par cellule et par jour ^[38].

III.4.1 Mécanisme

Il s'agit du retrait d'une base aberrante par une glycosylase. En fait, quatre enzymes sont impliquées dans la BER : une ADN glycosylase spécifique, une AP endonucléase, une ADN polymérase et enfin une ADN ligase ^[17]. Ce système fonctionne en trois étapes :

1^{ère} étape : l'ADN glycosylase spécifique coupe la liaison qui relie la base endommagée au sucre, la transformant alors en un site abasique. Il existe plusieurs ADN glycosylases présentant chacune une spécificité de substrat plus ou moins large. Le chapitre suivant leur est consacré car nous avons étudié le comportement de deux d'entre elles sur une puce à ADN. La multiplicité de ces enzymes permet la réparation d'une grande variété de dommages. Le type de terminaison généré par les différents clivages enzymatiques des sites abasiques est déterminant pour la sélection de la voie BER :

- le short patch est favorisé par la présence d'un nucléotide avec un résidu 3' intact (action d'une enzyme bifonctionnelle)
- le long patch est favorisé par l'existence d'un déoxyribose phosphate en 3' (action d'une enzyme monofonctionnelle) ^[11]. Mais ce mécanisme reste discuté en 2009 et la concentration en ATP à proximité du site abasique pourrait influencer la voie choisie ^[39].

2^e étape : une AP endonucléase coupe les liaisons phosphodiester entourant le site abasique, avec ou sans l'aide d'une AP lyase. En fonction de la conséquence de la première étape, deux voies sont possibles après le retrait de la base :

- voie courte (un seul nucléotide excisé) : l'ADN polymérase β interagit avec XRCC1 qui est la première protéine recrutée et l'ADN ligase III. Dans ce cas, il y a intervention de la protéine PARP qui recrute les autres protéines. Le rôle essentiel de la protéine XRCC1 est de stabiliser le complexe.

Cette voie est également opérationnelle s'il existe une compétition entre les mécanismes de NER et de BER pour un substrat ^[40] puisqu'en condition de stress oxydant interne, il est possible que les acteurs de la voie du long-patch soient limitants à cause de leur participation à la réparation d'autres lésions ^[16].

- voie longue (excision d'un fragment de 6 à 13 nucléotides) : cette voie nécessite la protéine nucléaire PCNA et les polymérases β ou δ ^[27]. La protéine PCNA coordonne les activités enzymatiques des polymérases et de la protéine FEN1 ^[39].

3^e étape : la base complémentaire est resynthétisée et reliée à l'aide de, respectivement, des ADN polymérases β et δ/ϵ et des ligases I et III.

Mais les polymérases impliquées dans le long patch ne sont pas encore parfaitement identifiées ^[16].

C'est le mécanisme « short patch » qui est responsable du retrait de la base oxydée 8-oxoG dans les cellules de Mammifères ^[11]. Mais pour quelques purines oxydées avec un fort pouvoir mutagène (comme 8-oxoG), la capacité de BER des cellules de Mammifères est limitée en comparaison de la capacité de réparation d'autres lésions endogènes fréquentes comme l'uracile ^[41] et les sites abasiques.

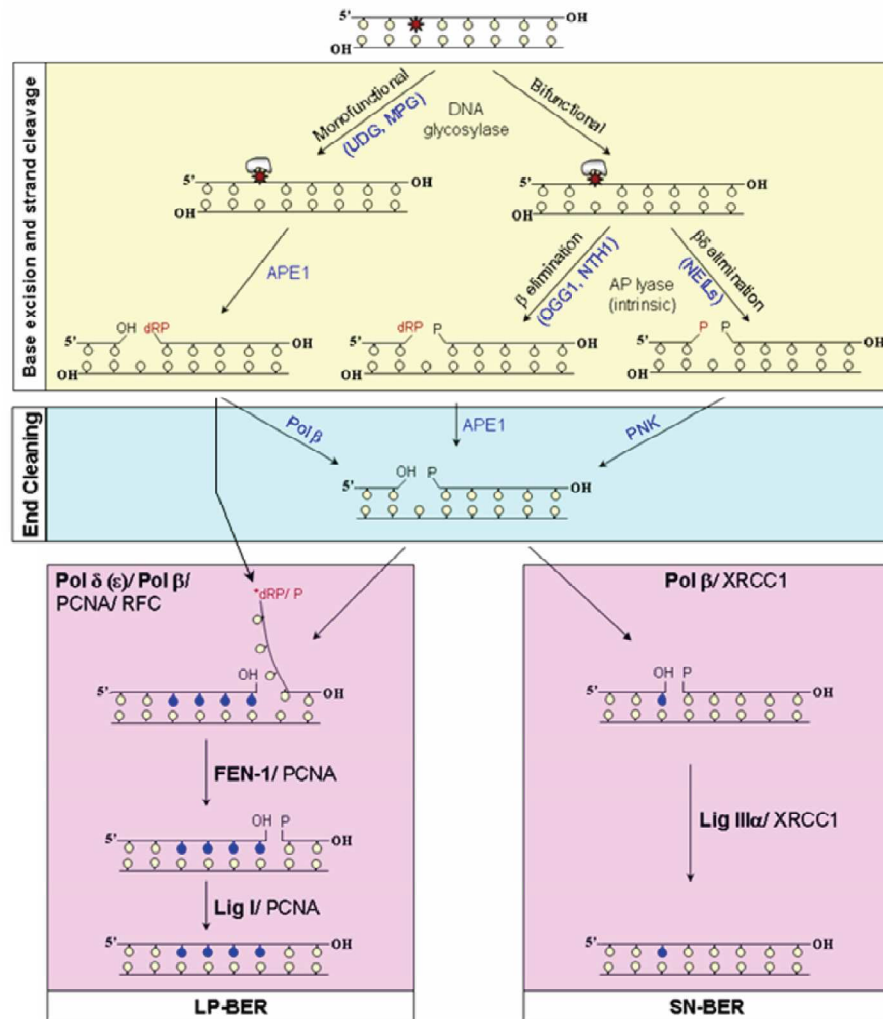


Figure 12 : Les deux voies de la BER chez l'Homme

d'après ^[42]. La base lésée est représentée avec une étoile rouge. LP = long patch, SN = single nucleotide.

La plupart des acteurs de la BER interagissent avec XRCC1, protéine essentielle pour la coordination et la stimulation de toute la réaction ^[43]. Ce mécanisme d'excision-resynthèse est en effet coordonné de façon rigoureuse pour assurer une réparation fidèle des sites abasiques sans entraîner des cassures de brins, eux-mêmes extrêmement toxiques pour les cellules. XRCC1 est une véritable plaque tournante de la BER qui reste sur le site de la lésion durant toutes les étapes.

III.4.2 Types de glycosylases impliquées dans la BER

Pour la réparation directe et la BER, les lésions sont reconnues par une protéine à activité enzymatique : une ADN glycosylase^[44]. Ces enzymes sont présentes dans le noyau cellulaire et ne sont pas induites par des lésions génotoxiques^[34]. Elles constituent d'excellents modèles pour l'étude des interactions entre ADN lésé et protéines^[5].

Les ADN glycosylases reconnaissent les bases modifiées (oxydées, alkylées, pontées, hydrolysées, fragmentées) et les purines à cycle imidazole ouvert^[45].

Ces enzymes sont des petites protéines de 16 à 42 kDa ne nécessitant pas de cofacteur métallique ou d'énergie exogène^[46]. Il existe 8 ADN glycosylases pour *E.coli*^[38] et 11 chez l'homme^[39]. La redondance de certaines de leurs fonctions souligne le rôle important de la réparation par excision de bases dans la cellule^[47].

Tableau II : ADN glycosylases humaines connues en 2009

ADN glycosylases humaines	Nombre d'acides aminés	Substrats	Activité lyase
UNG	(1) 304 et (2) 313	Uracile	Non
SMUG1	270	Uracile, 5-OH-meU	Non
TDG	410	T, U	Non
MBD4	580	T et U opposés à G	Non
MUTYH	535	A opposé à 8-oxoG	Non
OGG1	345	8-oxoG, fapyG	Oui
NTH1	312	fapyG, DHU, 5-OHU, 5-OHC	Oui
NEIL1	391	Comme NTH1 et fapyA, 8-oxoG	Oui
NEIL2	333	Activités de NTH1 et NEIL1	Inconnu
NEIL3	606	Inconnu	Inconnu
MPG	293	3-meA, hypoxanthine	Non

D'après^[39] *et*^[29]

Quatre glycosylases sont spécifiques des bases oxydées : NTH1, OGG1, NEIL1 et NEIL2^[42], ces deux dernières exerçant majoritairement leur activité sur de l'ADN simple brin.

Le mécanisme de reconnaissance des lésions est processif ; l'enzyme se lie à l'ADN de manière non spécifique, migre le long du duplex jusqu'au site de reconnaissance, catalyse sa réaction et continue à scanner l'ADN sans dissociation^[48]. La reconnaissance est déterminée par des liaisons hydrogènes multiples entre la protéine et les bases spécifiques^[9]. Le modèle généralement accepté suppose que les ADN glycosylases entrent en contact uniquement avec le brin d'ADN lésé (réparation extra hélicoïdale)^[13] mais bien que Fpg et OGG1 (glycosylases bactérienne et humaine) ne montrent aucune similarité dans leur structure, on sait qu'elles se lient également à la base C opposée à la lésion de type guanine oxydée^[49]. Ce mécanisme de reconnaissance a été décrit à l'aide d'approches structurales^[50].

Toutes les ADN glycosylases n'ont pas la même activité : certaines sont capables de simplement exciser la base par coupure de la liaison N-glycosidique, ce qui conduit à la formation d'un site abasique (AP). On parle de glycosylases **monofonctionnelles** ^[51]. Certaines sont également capables de réaliser la deuxième étape de ce processus de réparation, c'est-à-dire la coupure de la liaison phosphodiester en 3' ou en 5' du site AP. C'est le cas de la formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) de *E.coli*, bien connue pour son activité d'excision de la 8-oxoG. OGG1, NTH1 et NEIL1 sont, chez les Mammifères, les seules glycosylases qui possèdent cette activité AP lyase ^[52]. Il s'agit dans ce cas de glycosylases **bifonctionnelles**.

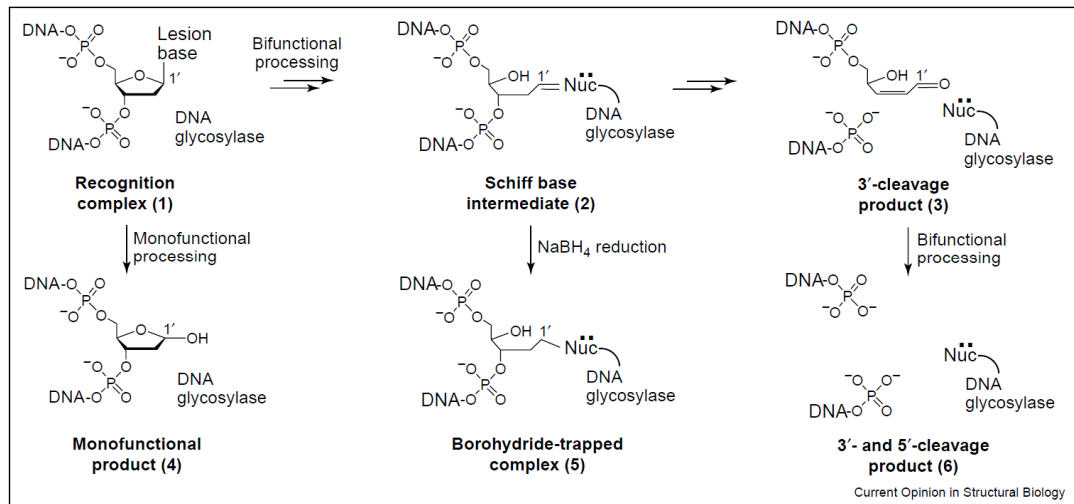


Figure 13 : Mécanisme des réactions catalysées par les ADN glycosylases

(1) Reconnaissance d'une lésion. Les glycosylases monofonctionnelles génèrent un site abasique après retrait de la base lésée (4). Les glycosylases bifonctionnelles catalysent d'autres réactions via la partie nucléophile du site actif (Nuc) (2). Le résultat sont les produits (3) et (6). Il est possible de stopper artificiellement la réaction en ajoutant NaBH₄; l'intermédiaire (2) est stabilisé en (5). D'après ^[53].

La liaison de protéines aux sites abasiques est importante pour la réparation ou la protection d'autres dégradations. Ce sont les AP-endonucléases qui hydrolysent l'ADN en 5' du site abasique et qui orientent ensuite la réparation vers le short-patch ou le long-patch ^[15].

Paradoxe biologique : les sites AP et les autres intermédiaires semblent plus cytotoxiques que la base altérée elle-même ^{[17] [54]}.

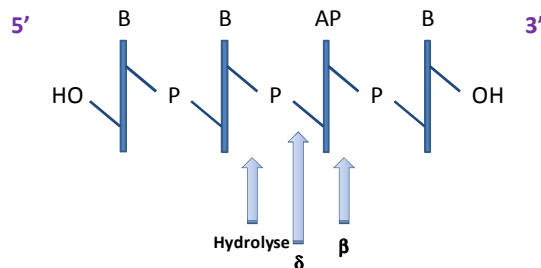


Figure 14 : Sites de clivage pour les AP endonucléases/lyases

AP = site abasique. Certaines glycosylases possèdent une activité AP lyase et permettant ainsi une réaction de bêta-élimination en 3' du site AP. Certaines de ces enzymes peuvent poursuivre la réaction avec une delta-élimination assurant ainsi le retrait du site AP (exemple de l'action de la Fpg) ^[55]. Les AP-endonucléases les plus importantes sur le plan quantitatif sont les hydrolases agissant en 5' du site abasique

Nous apportons ici quelques précisions sur certaines enzymes en insistant particulièrement sur celles que nous avons utilisées au cours de notre étude : Fpg, EndoIV, OGG1 et Ape1.

III.4.3 Les enzymes de la BER chez les bactéries

Les glycosylases bactériennes peuvent être classées en plusieurs catégories ^[5]. Elles peuvent être spécifiques des bases alkylées (AlkA d'*E. coli*), des cyclobutadipyrimidines (T4 endo V du phage T4), de l'uracile (UNG d'*E. coli*), des pyrimidines modifiées (endoIII d'*E. coli*), des purines modifiées (Fpg d'*E. coli*), ou des mésappariements (Mut Y d'*E. coli*).

III.4.3.1 Fpg protéine (Fapy-glycosylase ou Mut M)

ADN glycosylase de *E.coli* à large spectre d'action ^[27], elle appartient à la famille de protéines qui agissent à différents niveaux dans la réparation. Chez *E. coli*, 3 enzymes sont coordonnées pour empêcher l'incorporation et l'accumulation de 8-oxoG : Mut T, Mut M et Mut Y, il s'agit du système GO ^[8].

1^{er} niveau : Mut T élimine 8oxodGTP du pool de déoxynucléotides phosphate.

2^e niveau : Mut M (Fpg) est responsable du retrait de la base 8-oxoG incorporée.

3^e niveau : Mut Y est impliquée dans le retrait de A incorporée en face de 8-oxoG ^[5].

a) Description de la Fpg

Le gène de la Fpg contient 809 pdb^[56]. Il code pour une métalloprotéine de 30,2 kDa et 269 acides aminés avec un atome de Zn par molécule (motif en doigt de Zn à l'extrémité C-terminale). Elle possède 6 cystéines.^[57] Si le doigt de Zn est modifié, il est observé une diminution des capacités de liaison à l'ADN et des activités enzymatiques^[58]. Cette protéine est présente à raison de 100^[45] à 200 copies par cellule^[48].

b) Reconnaissance des lésions

La Fpg peut interagir avec 13 nucléotides (simple ou double-brin)^[59].

La structure du complexe Fpg/ADN est établie mais peu de choses sont connues sur la dynamique de reconnaissance du substrat par cette enzyme^[60].

En plus de la 8-oxoG et Fapy G, la liste des lésions reconnues par la Fpg *in vitro* a été établie en 2005 ; il s'agit de 8-oxoA, Fapy A, 5OH cytosine, 5OH uracile, dihydrouracile, uracilglycol, thymineglycol, hydantion, oxazolone^[7] et la methyl-fapy-guanine^[61]. La base 8-oxoA semble manquer de flexibilité et pourrait contribuer à l'inaccessibilité de la Fpg pour exciser cette base^[62].

Il est à souligner que les sites abasiques sont également d'excellents ligands pour la Fpg^[63]. Des études d'inhibition de son activité glycosylase ont montré que des oligonucléotides monobrin ou double brin contenant un site abasique réduit sont des inhibiteurs puissants de l'activité glycosylase^[64].

Le complexe Fpg/8-oxoG est spécifique et réversible. L'équilibre est déplacé par G/C en excès ou poly dIdC^[57].

c) Activité enzymatique de la Fpg

La Fpg clive de préférence les duplex d'ADN contenant une cytosine ou une thymine opposée à la 8-oxoG. L'activité est diminuée 5 fois ou 200 fois si la base opposée est respectivement une guanine ou une adénine^[38, 57].

Comme la paire de bases 8-oxoG/A est très faiblement clivée, les réparations accidentelles en T/A sont limitées^[8]. Les constantes de dissociation sont connues : Kd = 8,9 nM pour le duplex 8-oxoG/C et Kd = 340 nM pour le duplex 8-oxoG/A^[65].

La Fpg est une enzyme bifonctionnelle^[27] qui génère un site apurique ou apyrimidique^[5].

La Fpg possède en effet trois types d'activité :

- hydrolyse de la liaison N-glycosidique avec formation d'un site abasique
- élimination du 3'phosphate (beta élimination)
- élimination du 5'phosphate (delta élimination)^[60]

Il y a formation d'une base de Schiff (imine covalente) entre la Pro-1 de l'enzyme et le C1' du nucléotide excisé^[60].

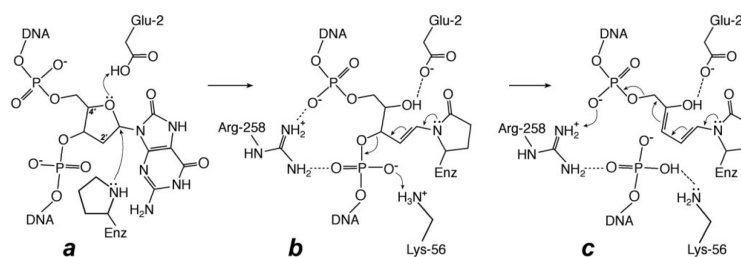


Figure 15 : Mécanisme réactionnel de la Fpg
d'après [49].

a : déplacement de la base et ouverture du cycle ribose

b : première étape de β -élimination

c : deuxième étape de β -élimination

La plupart des études se sont focalisées sur les interactions de l'enzyme avec les bases oxydées mais une étude récente montre l'importance de 7 groupements phosphate sur les deux brins d'ADN qui interagissent avec des acides aminés nucléophiles de Fpg [66].

III.4.3.2 Endonucléase III

C'est une protéine bactérienne (*E. coli*) de 27 kDa comportant 211 acides aminés, codée par le gène *nth* [67]. Elle a une activité de type glycosylase et endonucléase, coupant la liaison phosphodiester en 3' (par β -élimination) ; les substrats de cette enzyme concernent principalement les dérivés d'oxydation de la thymine ou de la cytosine, l'urée ou les diols de thymine [68].

Les mécanismes d'action de Fpg et Endo III sont assez proches (voir figure 16). L'excision de la base oxydée implique la formation d'une base de Schiff avec un intermédiaire imino entre un acide aminé de l'enzyme et le 2-désoxyribose. La coupure du brin d'ADN est réalisée par une β -élimination pour Endo III et une β - δ -élimination pour Fpg.

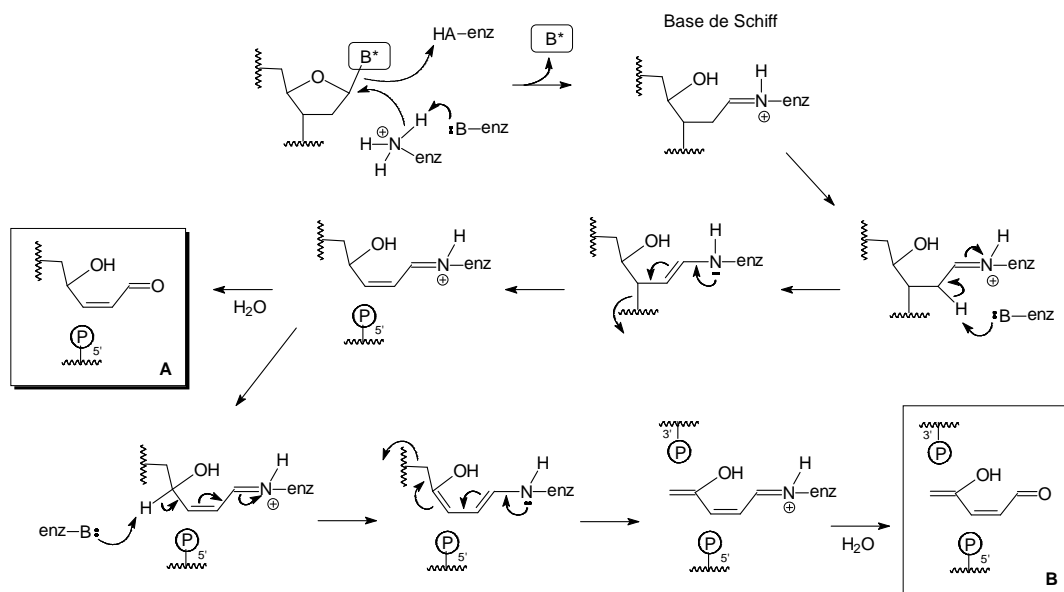


Figure 16 : Mécanismes de coupure

d'un ADN endommagé par les glycosylases/endonucléases de la BER, par β -élimination (A) ou par β - δ -élimination (B) [69].

III.4.3.3 Endonucléase IV

L'endonucléase IV ou Nfo, est codée chez *E. coli* par le gène *nfo*. C'est une métalloenzyme dont le site actif comprend trois atomes de zinc et qui fait partie des 5' AP-endonucléases très conservées chez les bactéries. Endo IV clive la liaison sucre-phosphate du site AP pour produire un groupement 3' hydroxyle et un 5'désoxyribose phosphate.

Par rapport aux autres AP-endonucléases, elle a la particularité d'inciser plus efficacement les sites AP lorsque le désoxyribose est oxydé et son action sur les sites abasiques ne dépend pas de la nature de la base du brin apparié. Toutefois sa coupure des sites abasiques oxydés est 100 fois moins rapide que celle de l'exonucléase III^[70]. L'endonucléase IV reconnaît certaines bases modifiées, dont les 5,6-dihydrothymine, 5,6-dihydrouracil, 5-hydroxyuracil et 2,6-diamino-4-hydroxy-5-*N*-methylformamidopyrimidine mais pas la 8-oxoG. Elle potentialise l'élimination de cette dernière par l'endonucléase III^[71].

III.4.3.4 Endonucléase VIII

L'endonucléase VIII (endo VIII ou *Nei*) est une protéine d'*E. coli* composée de 263 acides aminés qui présente une forte homologie de séquence avec MutM (Fpg). Elle est codée par le gène *nei*. Endo VIII possède à la fois une activité glycosylase et AP-lyase. Elle reconnaît et excise de nombreuses bases oxydées dont l'acide uréidoisobutyrique et l'urée, puis coupe la liaison phosphodiester du site abasique formé par un mécanisme de β,δ -élimination.

III.4.4 Les enzymes de la BER eucaryotes

Comme chez les bactéries, la réparation par excision de base fait appel à des glycosylases monofonctionnelles ou bifonctionnelles (voir tableau II), à des AP endonucléases, des polymérases et des ligases (voir tableau III).

La mutagénicité de 8-oxoG est contrée chez l'homme par 3 mécanismes différents^[72] :

➤ Prévention :

MTH1 hydrolyse 8-oxodGTP en 8-oxodGMP et empêche son insertion dans l'ADN natif^[43].

➤ Réparation :

8-oxoG est reconnue par la protéine OGG1 qui excise la lésion si elle est appariée à C ; reconstitution possible d'une paire de bases normales à ce stade.

➤ Correction :

La protéine MYH retire l'adénine située en face de 8-oxoG (lésion post-répllicative) ; il y a reconstitution d'une paire de base 8-oxoG/C, substrat pour OGG1.

III.4.4.1 Les enzymes OGG

Cette protéine est considérée comme l'homologue Eucaryote de la Fpg. Le gène humain de OGG1 produit deux transcrits différents ; la protéine OGG1 α est localisée dans le noyau tandis que OGG1 β est localisée dans la mitochondrie^[10]. L'activité glycosylase de la forme β n'a jamais été mesurée.

Deux protéines OGG différentes ont été mises en évidence en 1998^[73] avec un mécanisme réactionnel identique dans les cellules HeLa.

- OGG1 de 38 kDa clivant 8-oxoG quand elle est appariée avec C, T (ou G)
- OGG2 de 36 kDa clivant 8-oxoG quand elle est appariée à G et A.

Cette enzyme est aussi très efficace pour exciser la 8-oxo-7,8-dihydroadénine faisant face à une cytosine. ^[74].

OGG1 serait 80 fois plus lente que Fpg dans la réparation des lésions oxydatives ^[41, 75], son activité lyase est très faible ^[42]. Le résultat majoritaire de son activité *in vivo* est donc la formation d'un site abasique. Cette enzyme est cependant bifonctionnelle.

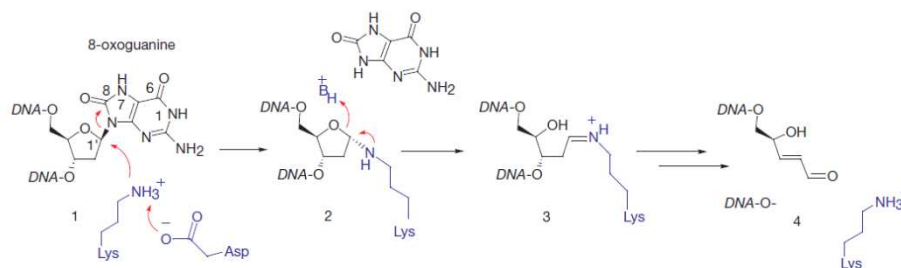


Figure 17 : Mécanisme enzymatique de OGG1
D'après ^[13].

La lysine du site actif de l'enzyme se lie au C1' du désoxyribose et expulse la base 8-oxoG. Les étapes suivantes conduisent à la coupure du brin d'ADN.

Dans des conditions de stress oxydant, l'enzyme OGG1 est acétylée, ce qui stimule son activité ^[76]. En fonction de son environnement, ses fonctions seront modulées. La présence de bases 8-oxoG libres inhibe son activité enzymatique et des concentrations physiologiques de magnésium limitent son rôle à celui d'une glycosylase monofonctionnelle ^[77].

Ape1, XPC et NEIL sont des protéines qui augmentent l'activité de OGG1 ^[76] en favorisant sa séparation du produit formé, c'est-à-dire les sites abasiques. Il existe en effet une interaction protéique importante à considérer entre OGG1 et Ape1 qui présentent des affinités similaires pour les sites abasiques. La forte affinité de OGG1 pour les sites AP pourrait servir à séquestrer ces lésions et les protéger de l'attaque d'autres enzymes, ce qui empêcherait la transcription et la réplication ^[78]. Mais le taux de clivage d'un site abasique par Ape1 est 400 fois plus rapide que par OGG1, ce qui entraîne une stimulation de l'activité glycosylase de OGG1 ^{[78] [79]}.

L'importance de OGG1 est confirmée par les études de polymorphisme de son gène. Le codon 326 a été largement étudié et le polymorphisme Ser326Cys est considéré comme un facteur de risque de cancer du poumon, de l'œsophage, du sein, du colon, de la peau et de l'ovaire ^[80]. Ce polymorphisme serait responsable d'une excision de la base 8-oxoG deux à six fois moins efficace, mais ces études épidémiologiques sont controversées ^[72].

III.4.4.2 Uracile ADN N-Glycosylase (UNG)

L'UNG élimine les bases uracile contenues par erreur dans l'hélice d'ADN.

C'est une enzyme retrouvée non seulement chez les bactéries et les eucaryotes mais même chez certains virus (Epstein Barr Virus et virus de l'Herpes). Le gène de cette enzyme contient 7 exons et code pour deux isoformes, UNG1 mitochondriale (304 acides aminés) et UNG2 nucléaire (313 acides aminés) ^[81]. L'UNG ne reconnaît pas l'uracile des ARN mais est capable de l'exciser dans un ADN simple brin ou double brin en face d'une base G ou A.

III.4.4.3 *Ape1, ou HAP1, Ref-1, APEX-1*

L'AP endonucléase-1 est une protéine de 37 kDa. C'est l'homologue humain structural et fonctionnel de l'exonucléase III d'*E. coli*. Elle représente plus de 95 % de l'activité d'incision des sites abasiques de l'ADN double brin dans les extraits cellulaires de Mammifères. L'incision d'un site abasique par Ape1 génère une extrémité 3'-OH qui permet l'extension par les polymérases. L'extrémité 5' est un résidu désoxyribose phosphate (5'-dRP) qui est ensuite enlevé et remplacé. Comme indiqué sur la figure 12, Ape1 interagit physiquement avec la flap endonucléase-1 (FEN1) et le proliferating cell nuclear antigen (PCNA) pour réparer les lésions de l'ADN dans le long patch repair^[82]. Ape1 nécessite du magnésium qui, pour des concentrations basses à modérées, facilite le clivage des sites apuriniques^[83].

Par ailleurs Ape1 a l'étrange particularité d'être une bi-enzyme. Sur un autre site actif indépendant, elle fonctionne comme une protéine thiol réductase, utilisant la thioredoxine pour remettre à l'état réduit fonctionnel des facteurs de transcription comme Nf-KB ou P53^[84].

III.5 La réparation par excision de nucléotides (NER)

Il s'agit de la coupure d'un petit oligonucléotide provoquant une distorsion de l'hélice.

La réparation par excision de nucléotides est un système de réparation très versatile car elle permet d'éliminer une grande variété de dommages tels que : les lésions induites par les ultraviolets, les dimères de thymine, les pontages intra-brin, les gros adduits de l'ADN comme par exemple ceux des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Elle est particulièrement importante pour la réparation des lésions formées par les aldéhydes (peroxydation lipidique). La lésion cycloadénine que nous avons étudiée dans notre système fait partie d'une classe unique de lésion oxydative de l'ADN réparée par NER et non par BER^[85].

Cette versatilité réside dans le mode de reconnaissance du dommage, qui est basé sur la déformation de la structure de l'ADN générée par la lésion, et non sur la modification chimique de la base elle-même. L'excision concerne 24 à 32 nucléotides chez les Eucaryotes^[86].

- ♦ C'est le processus le plus **efficace** pour éliminer les lésions encombrantes causant des distorsions structurales de l'ADN^[34].
- ♦ C'est le système de réparation le plus **polyvalent** en terme de la diversité des lésions qu'il peut réparer^{[1] [24]}.
- ♦ C'est le mécanisme le plus **compliqué**, impliquant 30 gènes^[5] et 30 protéines^[12].

On distingue deux voies de réparation :

➤ TCR : transcription coupled repair qui ne se produit que sur des gènes activés.

En effet, les gènes activement exprimés sont réparés de préférence avant les régions du génome non exprimées^[34].

➤ GGR : global genome repair qui se produit sur l'ADN qui n'est pas en cours de transcription

Des protéines s'assemblent autour de la lésion par un mécanisme séquentiel, formant un assemblage protéique parfois appelé **réparasome**.

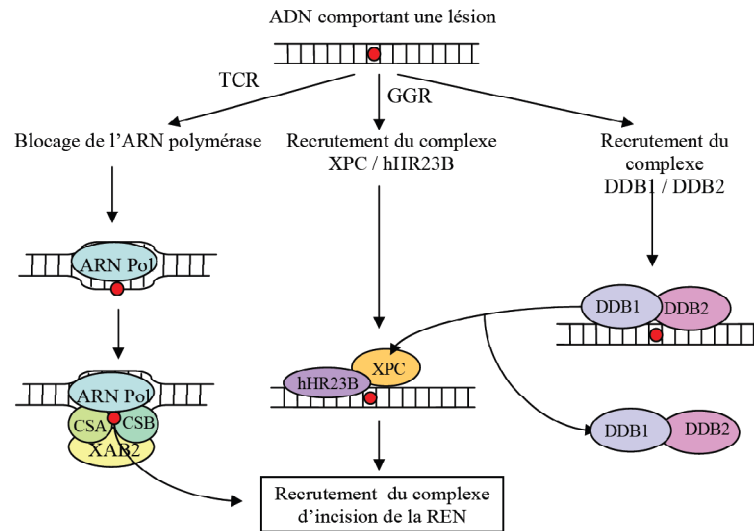


Figure 18 : Les voies possibles d'initialisation de la NER

D'après ^[87].

Dans le système TCR, l'ARN polymérase II se trouve bloquée dans son élongation et recrute alors les facteurs CSA et CSB, TFIIH et XPG pour ouvrir la double hélice d'ADN au niveau de la lésion (environ 10 nucléotides). Ensuite les deux systèmes suivent le même processus. Toute lésion qui interfère avec l'élongation de la transcription va être un substrat pour le TCR.

La NER est composée de quatre étapes successives, schématisées sur la figure 19 :

1^{ère} étape : reconnaissance des dommages par le complexe XPC-hHR23B (XPC-R23) ^[88]. La protéine UV-DDB (UV damaged DNA binding protein complex) joue un rôle très important dans la NER des cellules de Mammifères. Elle pourrait permettre l'accès des enzymes de réparation aux photolésions de l'ADN dissimulées dans la chromatine ^[89]. Quand les cellules sont exposées aux UV, l'accumulation de P53 active la transcription de DDB2 ^[90].

2^e étape : ouverture de l'ADN de part et d'autre de la lésion grâce à l'action des hélicases TFIIH, XPB et XPD (remarque : les protéines XPA et RPA se fixent à l'ADN lors de cette étape). TFIIH a une activité hélicase qui déroule le duplex à proximité de la lésion ; elle contient Rad 3 et Rad 25 chez la levure, XPB et XPD chez les Mammifères ^[91].

3^e étape : excision d'un nucléotide par des nucléases spécifiques (XPG et ERCC1-XPF) et génération d'un fragment d'environ 30 nucléotides.

4^e étape : synthèse de la séquence complémentaire par l'ADN polymérase ϵ/δ et ligation du nucléotide excisé par l'ADN ligase I ^[24].

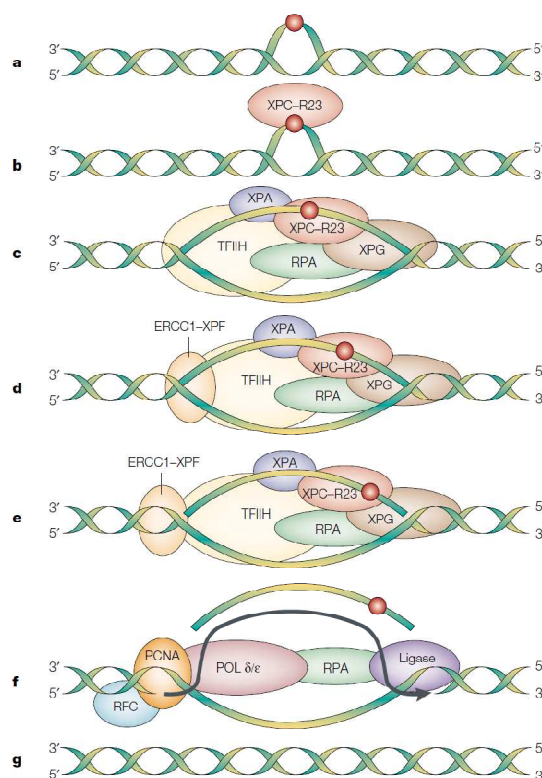


Figure 19 : Représentation schématique de la NER

D'après [24].

a : altération de la structure du duplex d'ADN

b : reconnaissance de cette lésion par XPC, stabilisé par R23

c : liaison de plusieurs autres protéines (XPA, RPA, TFIIH, XPG).

d : la liaison de ERCC1-XPF stabilise le complexe multi-protéique

e : double incision du brin lésé avec les activités endonucléases de XPG d'un côté et de ERCC1-XPF de l'autre

f : excision du fragment lésé et intervention d'ADN-polymérases et ADN ligase

g : retour à la configuration initiale

Il existe des liens étroits entre la transcription, la réparation et le cycle cellulaire. Par exemple TFIIH, composant de la NER, est impliquée dans l'initiation de l'ARN polymérase II et certainement aussi dans la régulation du cycle cellulaire. De même, RPA est aussi impliquée dans la réplication et PCNA peut aussi servir de médiateur entre le contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN.

De manière très simplifiée, ce tableau résume les différentes protéines impliquées dans les mécanismes de BER et NER.

Tableau III : Récapitulatif très simplifié des protéines impliquées dans les étapes de BER et NER

ETAPES	BER	NER
Reconnaissance du dommage	Glycosylases	XPC-R23 ou DDB1 et 2
Excision du dommage	Glycosylases	TFIIH, XPF, XPG (ERCC1)
Clivage liaisons phosphodiester	Endonucléases ou glycosylases	TFIIH, XPF, XPG
Resynthèse	Polymérases β, δ, ϵ , PCNA ou XRCC1	Polymérases δ, ϵ et PCNA
Ligase	Type I ou III (et XRCC1)	Type I

III.6 La réparation des mésappariements

Cette réparation entraîne le retrait d'un fragment d'ADN de plus de 100 nucléotides ^[27].

La présence d'un mismatch ne provoque pas de dramatiques modifications structurales de l'ADN mais il déstabilise localement la double hélice en modifiant le point de fusion. Les protéines de réparation des mismatch semblent aussi interagir avec des protéines impliquées dans le cycle cellulaire ^[92].

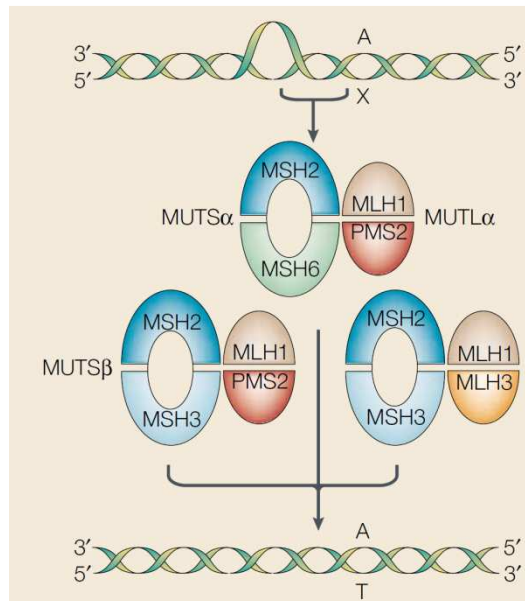


Figure 20 : Protéines impliquées dans la réparation des mésappariements
D'après ^[24].

Dans les cellules humaines, la reconnaissance de ces lésions est accomplie par un complexe protéique MUTSα (composé de MSH2 et MSH6). D'autres complexes protéiques agissent ensuite : MUTSβ, MLH1, PMS2, MLH3.

La réparation des mésappariements (MR) est un mécanisme qui permet de distinguer les deux brins afin de détecter quelle est la base à modifier, ce dont n'est capable aucun des mécanismes précédents. Ces mésappariements sont issus soit d'erreurs d'incorporation lors de la réplication, soit de la formation de structures secondaires, ou encore de la désamination de la cytosine méthylée en thymine. Le principe de la réparation est similaire à celui des mécanismes par excision. Diverses exonucléases interviennent pour dégrader le brin d'ADN jusqu'à une centaine de bases après le mésappariement, puis une ADN polymérase resynthétise le fragment manquant et enfin une ADN ligase termine le processus.

Ce système de réparation a été largement étudié chez les bactéries. Il est connu sous le nom de MUT HLS chez *E. coli*. Mut S se lie à la zone mésappariée, puis Mut L et Mut H agissent de façon synergistique pour enlever la zone portant la séquence erronée sur le brin non méthylé ainsi que de nombreuses hélicases, polymérases et ligases. La distinction entre le brin correct et le brin erroné se fait d'après la méthylation des cytosines car ce type de réparation intervient juste après la réplication de l'ADN alors que le brin néosynthétisé, support d'erreur possible lors de sa synthèse, n'a pas encore été traité par les ADN méthylases.

Chez l'homme, on retrouve des homologues de Mut S (MSH 2,3 et 6) ainsi que de Mut L (MLH 1, 3 et PMS2). Les interactions protéiques semblent un peu plus complexes que chez les bactéries.

Ces modèles impliquent la perturbation transitoire de l'organisation de la chromatine pour faciliter l'accès des molécules de réparation. La coordination réalisée par les chromatin assembly factors (CAF-1 par exemple) a été reportée dans la réplication de l'ADN et la réparation^[93].

III.7 La réparation des lésions multiples

Tableau IV : Eléments de radiobiologie

	Domage de base	Cassure simple brin	Cassure double brin
Energie nécessaire pour créer le domage	1 à 10 eV/nm ³	10 à 100 eV/nm ³	>100 eV/nm ³
Nombre de dommages par Gy	10 ³ à 10 ⁴	10 ³	40
Temps de réparation pour la moitié des dommages	1 à 10 min	10 à 20 min	50 à 60 min

D'après Goodhead^[94].

Plusieurs études par électrophorèse en gel ont mesuré l'effet de certaines lésions multiples sur la coupure d'oligonucléotides.

Ces dommages sont considérés comme faiblement réparés dans la cellule^[95]^[96]. De plus ils présentent un grand danger pour la cellule car si deux lésions sont sur les brins opposés et toutes les deux excisées, le résultat est une cassure double-brin.

En fonction de la nature des lésions, les conséquences de la réparation seront différentes : un site abasique et une base 8-oxoG sur deux brins d'ADN opposés seront réparés de manière séquentielle, limitant la formation de cassures double-brin tandis que la réparation de deux sites abasiques opposés engendre une cassure double brin et donc une lésion très mutagène voire létale^[97].

Ce processus n'est pas affecté par la présence d'une troisième lésion mais est accentué par la présence d'une 8-oxoG tandem en 5' à un des deux sites abasiques^[98].

L'étude de cette réparation est difficile car elle dépend non seulement du type de lésion mais aussi de la distance entre les deux lésions^[99].



Figure 21 : Schéma simplifié de la réparation par BER de 2 lésions proches
une base 8-oxoG (en noir) et une cassure simple brin. D'après Harrison ^[95].

A : une base de distance

B : trois ou plusieurs bases de distance

III.7.1 Cas des lésions sur brins opposés

Quelques exemples ont été décrits dans la littérature même si les études à partir d'extraits nucléaires sont rares ^{[100] [101]}.

➤ Lorsque deux uraciles sont à moins de 7 bases sur des brins opposés, leur coupure est possible et se traduit par une coupure double brin de l'ADN, sans doute sous l'action de l'UNG, car elle ne se produit pas dans les souches bactériennes ung⁻ ^[102].

➤ On sait que la liaison de la protéine **Fpg** à la base 8-oxoG est inhibée si une autre lésion, en particulier une cassure simple brin, se trouve sur le brin complémentaire ^[103], ce qui ne semble pas le cas pour OGG1 ^[100]. Mais l'excision d'une 8oxo-G par l'enzyme humaine OGG1 est fortement diminuée par la présence d'un site abasique sur le brin opposé ^[104].

En utilisant des extraits nucléaires de cellules de hamster, la réparation des sites abasiques est diminuée par deux lorsqu'ils sont opposés à une base 8-oxoG.

➤ La capacité de **Ape1** à exciser un site abasique n'est pas modifiée par la présence d'une dihydrothymine ou d'une 8oxo-G sur le brin opposé, mais est fortement inhibée par la présence d'un deuxième site abasique situé sur le brin opposé, de 1 à 3 bases en 3' du premier ^[105].

➤ De même la présence d'une dihydrothymine face un site abasique sur un oligonucléotide double brin, diminue la réparation par des extraits cellulaires, en inhibant l'action de la polymérase β et la ligation ^[106].

III.7.2 Cas des lésions sur le même brin (lésions tandem)

Concernant plus spécifiquement les lésions tandem (sur le même brin d'ADN), il a été montré qu'une lésion 8-oxoA inhibe l'incision d'un site abasique par **Fpg** quand elle est située à moins de 5 bases du côté 5' ou 3' ^[107]. Mais elle n'inhibe l'action de **Ape1** que en étant du côté 3' et à moins de 2 bases du site abasique. Cette base 8-oxoA n'a pas d'effet sur la coupure par **Nth**. Une inhibition identique sur la coupure d'un site abasique par Fpg et Nth est observée lorsque c'est une 8-oxoG qui est la lésion tandem située à moins de 5 bases ^[108]. Les **endonucléases III et VIII** qui sont très efficaces pour exciser les dihydrouraciles dans l'ADN perdent leur efficacité lorsque ces lésions sont en tandem ^[109].

Des clusters de 3 lésions formés de deux sites abasiques opposés associés à une 8-oxoG en tandem, entraînent la coupure de la double chaîne lorsque l'oligonucléotide est traité par des extraits nucléaires ^[110].

IV FONCTIONNEMENT DES SYSTEMES DE REPARATION

IV.1 Déclenchement de la réparation et kinases

La réponse à des agents génotoxiques met en route des cascades de kinases qui relient les dommages de l'ADN à l'activation de facteurs de transcription régulant l'expression de systèmes de réparation. L'activation des kinases ATM (Ataxia Telangectasia Mutated), ATR (Ataxia Telangectasia Rad3 Related) et DNA-PK (DNA dependent protein kinase) est un élément essentiel de la réponse ^[111].

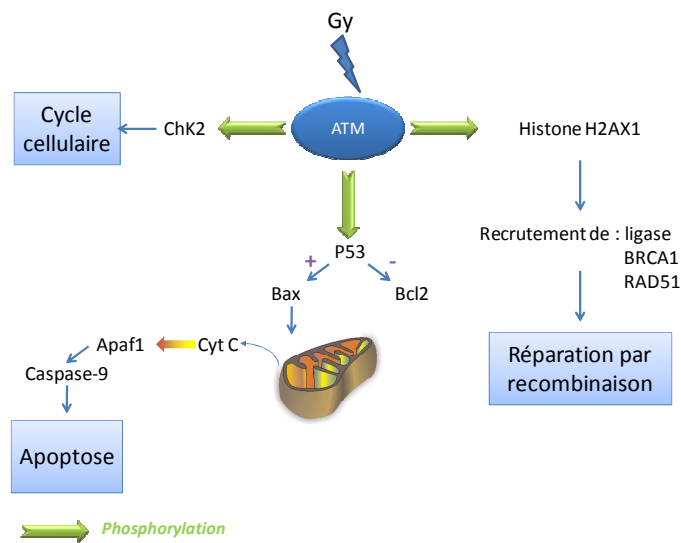


Figure 22 : Réparation et kinases

La protéine ATM initie et coordonne non seulement la réparation par recombinaison mais aussi le cycle cellulaire et l'apoptose.

En cas de coupures doubles brins, l'activation des kinases ATM et ATR recrute sur le site Tel1 (une phosphatidyl inositol 3- like protéine kinase) et les protéines du système NHEJ. Si la DNA-PK a le temps d'être activée, ces protéines sont remplacées par Mec1 qui permet la fixation du système de réparation par recombinaison homologue ^[112]. La phosphorylation de l'histone H2Ax est un élément essentiel de la mise en place de la réparation par recombinaison et permet l'arrivée de BRCA1. Ce système de kinases permet l'intégration de la réparation dans le cycle cellulaire et entrainera l'arrêt de ce dernier en cas de difficulté à réparer un trop grand nombre de lésions, voire le passage en apoptose.

IV.2 Expression des gènes de réparation et adaptation au stress

Les gènes de réparation du génome humain vont être induits ou réprimés par différents facteurs. Le plus important de ces facteurs est le stress par le biais de l'activation de kinases ou de facteurs de transcription spécifiques.

L'irradiation gamma induit l'expression des ARN de PARP, Ku 80, Rad51 et Ligases I et III ^[113].

Dans des cellules souches de **kératinocytes**, une irradiation par 2 Gy de rayons gamma n'induit que 5 gènes de réparation (RAD52, RAD23B, XAB1, BCCIP, XRCC5) sur les 26496 gènes mesurés par microarray ^[114]. L'expression de XPC dans des kératinocytes augmente dès 4 heures après exposition aux UVB ^[115]. Ainsi des **kératinocytes** en culture traités avec de l'ADN endommagé par les UVC vont avoir une capacité de résistance aux UVB accrue, alors que le traitement par un ADN ou polynucléotide non endommagé est sans effet ^[116].

La protéine Ape1 est surexprimée dès la première heure après irradiation gamma de **fibroblastes** ^[117]. De même dans des fibroblastes en culture, le gène de Ape1 est fortement surexprimé après une exposition à 5J/cm² d'UVA ^[118].

Les activités d'excision *in vitro* des **extraits nucléaires de cellules HeLa** sur des oligonucléotides contenant des furanes analogues de sites abasiques (attribués à Ape1) sont plus élevées dans les cellules en G1 du cycle que dans celles en G2 ^[119]. Après un stress radioinduit les activités hNTH1 et Ape1 n'augmentent que dans les cellules en G1. Mais l'activité de coupure des 8-oxoG par OGG1 reste constante.

IV.3 Adaptation par translocation nucléaire

Beaucoup de recherches portent sur le déclenchement des voies de signalisation agissant sur la réparation de l'ADN, mais peu d'entre elles traitent de la régulation des systèmes de réparation à savoir la modulation positive et négative de ces activités. Certains gènes de réparation peuvent être induits et leur produit peut être dégradé s'il est ubiquitinylé, ce mécanisme constitue en soit une régulation.

Après un stress, un grand nombre de protéines intervenant dans la réparation sont transportées depuis le cytosol vers le noyau par les protéines participant au trafic intracellulaire. A l'inverse une translocation nucléaire directement dépendante de la présence de dommages a été mise en évidence pour des protéines impliquées dans :

- . La BER : OGG1, Ape1
- . La NER : DDB1/DDB2 ^[120]
- . La NER-TCR : CSA ^[121]
- . La MR : MSH2, MSH6 ^[122]

Les effecteurs entrant en jeu afin de provoquer cette translocation ne sont pas toujours connus. Cependant, il a été montré que la protéine XPA peut être transloquée vers le noyau de manière ATR dépendante ^[123]. Après un stress UVA, OGG1 et Ape1 quittent leur localisation pour gagner des foci nucléaires et ce mouvement est annulé par ajout d'antioxydants, montrant que cette translocation est redox dépendante ^[124].

Une fois la réparation des dommages effectuée, la cellule doit à nouveau retrouver un niveau de réparation basal. La translocation des enzymes de réparation apparaît donc comme une voie de régulation potentiellement importante des systèmes de réparation, dont l'implication concrète reste à déterminer.

IV.4 Variations physiologiques

Les activités de réparation de l'ADN ne sont pas constantes mais subissent de nombreuses influences physiologiques.

Ainsi la NER est soumise aux **rythmes nycthéméraux** induits par les changements hormonaux en cours de journée. L'activité dans le cerveau de souris est ainsi retrouvée plus élevée en fin de journée ^[125].

L'**âge** a également une influence sur les activités de réparation. Chez 30 sujets de 26 à 106 ans, l'expression des gènes mesurée par microarray, montre une forte augmentation de l'expression des gènes de réparation de la BER (OGG1 et UDG) et de défense antioxydante ^[126]. Le transfert vers le noyau et la mitochondrie de OGG1 et Ape1 serait diminué avec l'âge, ce qui expliquerait les anomalies de la réparation constatées chez les sujets âgés ^[127]. Une comparaison de l'activité dans le noyau et les mitochondries du cerveau de souris vieillissantes montre une diminution des activités OGG1, UDG, et NTH1 uniquement dans la mitochondrie, alors que la teneur en ces protéines ne varie pas avec l'âge des animaux ^[128]. Ces enzymes étant codés dans le noyau, cette différence traduit sans doute la diminution du transfert vers la mitochondrie.

V CONSEQUENCES DES LESIONS POUR LES ETRES VIVANTS

V.1 Mutations et évolutions

Les mutations interviennent lorsque l'excès de lésions ou une déficience de réparation laisse persister ces anomalies au moment où le cycle repart et que les polymérases infidèles recopient mal cet ADN lésé ^[129].

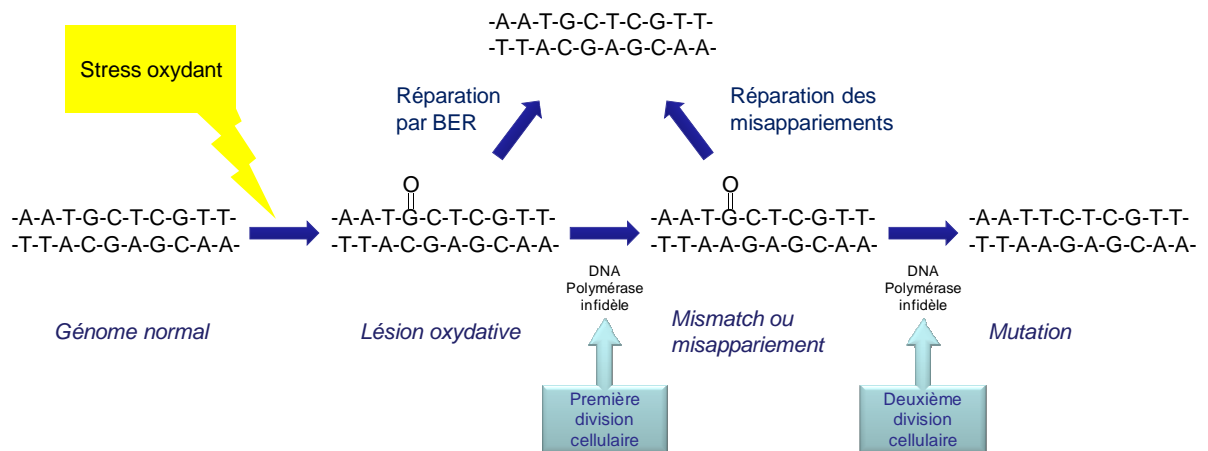


Figure 23 : Mécanisme de formation d'une mutation

Chez *Escherichia coli* transfecté au moyen d'un vecteur d'ADN soumis préalablement à un stress oxydatif (Fe^{++}), Mc Bride et coll. ^[130] ont pu augmenter de 20 à 80 fois le taux de mutation de ce microorganisme. Les mutations les plus fréquentes étaient des transversions $\text{G} \rightarrow \text{C}$ ou $\text{G} \rightarrow \text{T}$ et des transitions $\text{C} \rightarrow \text{T}$. Un peu plus tard, toujours chez *E. coli*, la 8-oxoG fut reconnue comme causant des substitutions $\text{G} \rightarrow \text{T}$ et $\text{A} \rightarrow \text{C}$ entre autres mutations ^[131-132]. In fine, cette modification de l'ADN induit des transversions GC vers TA souvent observées spontanément dans les cellules cancéreuses sur des oncogènes ^{[133] [134]}. Ces transversions sont des mutations du génome, transmissibles aux cellules filles.

Certains **virus** codent pour des enzymes chargées de modifier les bases de l'ADN, des cytosine désaminases générant des uraciles dans l'ADN, et des Uracil ADN-glycosylases chargées d'éliminer ces uraciles par excision. Au cours de ce processus, des mutations vont apparaître faisant muter le virus et lui permettant d'échapper aux défenses de l'organisme.

V.2 Apoptose

L'apoptose ou Mort cellulaire programmée est un processus physiologique utile dans l'embryogénèse, l'hématopoïèse ou la sélection des lymphocytes T, mais qui devient pathologique en réponse aux agressions cellulaires. Dans ce cas il consiste en un suicide altruiste des cellules anormales pour protéger l'organisme atteint.

Les lésions de l'ADN constituent des signaux pour la cellule, modifiant le cycle cellulaire et induisant l'apoptose, dont les mécanismes de transduction commencent à être connus ^[135]. Le mécanisme passe par **une activation de P53** déclenchant une apoptose mitochondriale dépendante de l'activation des caspases-9.

➤ P53 est nécessaire au check point en G1 du cycle cellulaire, et les cellules mutées sur P53 ont perdu la possibilité d'arrêter le cycle cellulaire. P53 est un facteur de transcription très souvent altéré dans les cancers qui est activé par les stress génotoxiques.

➤ P53 est nécessaire aussi bien à la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER), que par excision de base (BER). Il est encore difficile de savoir si P53 interagit directement avec le complexe de réparation de la NER ou par le biais d'un gène dont l'expression est induite par P53 comme p48XPE, XPC.

➤ P53 participe ainsi à l'excision-réparation :

- ♦ des dommages induits par H₂O₂. Cette voie constitue une cible pour les chimiothérapies des cancers P53 déficients.
- ♦ des lésions UV induites de l'ADN, mais n'a pas d'effet sur la réparation couplée à la transcription ^[136].

V.3 Carcinogénèse

V.3.1 Maladies héréditaires

Les maladies héréditaires concernant les anomalies de la réparation de l'ADN sont très rares (5% des cancers humains). Certaines anomalies génétiques des protéines de réparation sont responsables de cancers familiaux de l'enfant. Le plus connu de ces cancers est le Xeroderma pigmentosum, maladie génétique autosomique récessive qui entraîne des cancers cutanés rapidement mortels. Dans la forme commune du XP, les premiers signes cutanés apparaissent dès 1 à 2 ans. C'est d'abord une hypersensibilité aux rayons UV du soleil (érythèmes intenses), puis des altérations de la peau exposée (sécheresse cutanée, taches hyperpigmentées, kératoses). Les tumeurs cutanées ophtalmologiques apparaissent dès l'âge de 8 ans. La fréquence des cancers cutanés est multipliée par 4800 chez les sujets de moins de 20 ans par rapport à un groupe témoin. La maladie s'accompagne de troubles ophtalmologiques (inflammations de la conjonctive et de la cornée) et d'anomalies neurologiques (20% des malades XP ont une perte progressive de neurones du cortex cérébral entraînant des troubles neurologiques sévères). Les enfants ne peuvent sortir que la nuit (d'où le nom des « enfants de la lune »), ou revêtus d'une combinaison intégrale. Les autres cancers héréditaires figurent sur le tableau ci-après.

Tableau V : Pathologies induites par des défauts de réparation de l'ADN

Pathologie	Clinique	Anomalie de la réparation
Xeroderma pigmentosum	Photosensibilité, tumeurs cutanées, cataractes, anomalies neurologiques	Défaut de la NER ^[137]
Syndrome de Cockayne	Petite taille, anomalies squelettiques, atrophie optique, surdité, retard mental	Défaut de réparation par NER des lésions UV-induites
Trichothiodystrophie	Ichtyose congénitale, cheveux épars, déficit intellectuel, retard de croissance.	Défaut de la NER
Anémie de Fanconi	Anémie, malformations rénales et cardiaques	Pas encore connu, plusieurs gènes impliqués
Syndrome de Bloom	Retard de croissance, déficit immunitaire, susceptibilité aux cancers	Défaut des protéines hélicases
Syndrome de Werner	Cataracte, ostéoporose, athérosclérose, perte d'élasticité cutanée, petite taille, diabète	Défaut des protéines hélicases
Ataxie-telangiectasie	Ataxie cérébelleuse, telangiectasies, déficit immunitaire.	Altérations du cycle cellulaire
Cancer colorectal héréditaire	Tumeurs de l'intestin grêle	Anomalies dans la réparation des mésappariements ^[34]
Syndrome de Nijmegen	Microcéphalie, infections fréquentes, vieillissement précoce et susceptibilité aux cancers	Défaut de recombinaison homologue
MCSZ (microcephaly and seizures)	Microcéphalie, convulsions, retard de développement	Mutation sur le gène de la polynucléotide kinase 3'-phosphatase*

*Nouveau syndrome décrit en 2010 ^[138]

V.3.2 Maladies acquises

L'exposition à des facteurs de risques, dits facteurs carcinogènes, qu'elle soit due à des comportements à risque comme le tabagisme, à une pollution importante ou à la vie professionnelle, est une des principales causes des cancers. Or dans leur quasi-totalité, ces facteurs carcinogènes vont créer des lésions dans nos gènes soit parce qu'ils forment des adduits à l'ADN (HAP, tabac, aflatoxine des moisissures), ou des photoproduits (rayons UVA et UVB), soit parce qu'ils sont des générateurs directs ou indirects de radicaux oxygénés et d'espèces réactives de l'oxygène (nickel, cadmium, chrome, fer, tabac, rayons ionisants, ozone, amiante). Ces défauts de réparation vont provoquer une augmentation du nombre de lésions dans l'ADN cellulaire. Le phénotype associe le plus souvent un vieillissement prématuré, une photosensibilité, une sensibilité augmentée aux radiations ionisantes et un risque de cancer augmenté ^[139].

Les travaux de Ames et de son équipe ^{[140] [141]} montrent qu'il existe une corrélation nette, au sein des espèces animales, entre le risque de cancer à un âge donné, et l'excrétion urinaire de bases oxydées de l'ADN. En Europe, la comparaison du taux de 8-oxoG dans les lymphocytes humains, montre chez les sujets de sexe masculin un gradient Nord/Sud et un risque élevé de cancer colorectal dans ces pays ^[142].

Nous pouvons citer quelques exemples d'association de défauts de réparation et de signes cliniques décrits dans la littérature :

- ♦ La diminution d'expression de certains gènes NER semble associée à un risque d'augmentation des cancers ^[40].
 - ♦ Il a été montré une association entre les défauts de la BER et le risque de cancer pour trois types d'organe : le poumon, le sein et l'ovaire.
 - ♦ Le gène d'OGG1 est situé sur une région d'un chromosome délété dans le cancer du poumon ^[5] et son absence ou la diminution de son activité est associée à ce cancer ^{[34] [143]}.
 - ♦ Des défauts de la BER ont également été associés aux désordres neurodégénératifs.
- En revanche, les défauts de réparation de l'ADN ne semblent pas être responsables de cancers gastriques. Mais de nombreuses controverses persistent pour les cancers de l'intestin, de la prostate et du système hématopoïétique ^[43].

Nous pouvons citer également le gène XPD (Asp/Asp contre His/His au codon 1104 ^[144] ou Asp/Asp en 312 contre Asn/Asn ^[145]) dans le cancer du poumon, de nombreuses mutations du gène BRCA1 et BRCA2 dans le cancer du sein ^[36], le gène XRCC1 (formes Arg/Arg 399 contre Gln/Gln) dans le cancer de la prostate, du sein ^[146], ou du cancer du poumon non à petites cellules ^[147], plusieurs formes du gène MSH2 ou MLH1 dans le cancer colorectal ^[148], le gène ATM dans les lymphomes.

Le suppresseur de tumeur P53 joue un rôle important dans la régulation de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. Comme nous l'avons vu précédemment, P53 interagit avec deux protéines de la BER : OGG1 et Ape1. Elle augmente l'activité de ces deux enzymes. La mutation du gène de P53 est retrouvée dans plus de 50% des cancers et est associée à une faible réponse aux agents thérapeutiques ^[149].

V.3.3 Thérapeutique

Dans le cadre du traitement du cancer, le but de la chimiothérapie et de la radiothérapie est d'induire des lésions de l'ADN. L'inhibition des systèmes de réparation pourrait donc potentialiser ces traitements.

Prenons l'exemple de la résistance liée à la réparation par excision de base :

La BER est capable de réparer les bases alkylées. Son rôle dans la résistance aux traitements à base d'agents alkylants est donc aussi important ; il a été mis en évidence au cours d'études pré-cliniques où l'inhibition de la BER a permis d'augmenter la sensibilité à ces molécules. Il est à noter qu'il existe des protéines compétitives pouvant diminuer la réparation de l'ADN : protéines à haute affinité pour l'ADN (protéines de la chromatine, histone H1, PARP) ^[44].

Plusieurs stratégies sont utilisées pour diminuer l'activité de la BER dans les cellules tumorales. Elles visent toutes des points clés du mécanisme comme le blocage de l'étape de resynthèse par la polymérase β (acide pamoïque), l'inhibition de Ape1 (Lucanthone) ^[150] pour empêcher la coupure du brin d'ADN au niveau des sites abasiques, l'inactivation de la PARP en vue d'inhiber le recrutement de la polymérase β (CEP-6800[®]).

A la vue du rôle des lésions de l'ADN dans la carcinogenèse, il est donc en apparence paradoxal de constater que la plupart des traitements destinés à lutter contre le cancer utilisent une génération massive de radicaux libres oxydant l'ADN ou forment des adduits

directs sur l'ADN. Ainsi pour la radiothérapie, la photo chimiothérapie, ou certaines chimiothérapies utilisant la bléomycine, l'adriamycine ou la doxorubicine, la formation du radical hydroxyle attaquant l'ADN est le mode d'action principal pour forcer les cellules cancéreuses à entrer en apoptose. D'autres antitumoraux forment des adduits directs, essentiellement sur la guanine de l'ADN qui est la base la plus sensible aux réactions d'oxydation et d'addition.

C'est pourquoi la réponse des malades à une chimiothérapie ou radiothérapie dépendra de leur capacité d'expression, ou de l'efficacité du polymorphisme de leurs systèmes de réparation ^[151]. A titre d'exemple,

➤ le taux d'expression du gène de l'endonucléase **Ape1** est directement corrélé à la sensibilité des tumeurs cervicales à la radiothérapie ^[152].

➤ les lésions dues au cisplatine sont réparées par la voie NER (excision de nucléotides) mais aussi MR (réparation des mésappariements) ^[153]. C'est pourquoi l'expression d'une protéine impliquée dans la NER, **ERCC1**, est prédictive de la survie des patients après traitement ^[154]. Une autre étude montre des résultats similaires chez des malades traités pour leur cancer du poumon par une association de cisplatine et de gemcitabine, qui survivent plus longtemps s'ils présentent une faible expression de ERCC1 dans leur tumeur ^[155].

V.4 Sénescence

Une autre conséquence des lésions de l'ADN est l'entrée des cellules en sénescence qui intervient lorsque les télomères des chromosomes sont endommagés. Ce processus de vieillissement qui atteint de façon normale les cellules différenciées au bout d'un certain nombre de subdivisions est appelé la sénescence répllicative. Les cellules ne peuvent plus proliférer, leur taille augmente en prenant une forme plus aplatie. Un grand nombre de protéines de réparation sont présentes dans les télomères, Ku, DNA-PKcs, RAD51D, MRN (MRE11/RAD51/NBS1), BRCA1, hRad9 et PARP1, indiquant leur importance pour protéger ces structures. La sénescence post stress, comme la sénescence répllicative, se caractérise par des modifications morphologiques, un arrêt prolongé et irréversible de la croissance cellulaire, une perte du potentiel clonogénique, un raccourcissement des télomères ^[156].

CHAPITRE II :

METHODES D'ETUDE DES INTERACTIONS

ADN/PROTEINES

L'étude des interactions ADN/protéines est fondamentale pour notre compréhension des mécanismes de croissance, développement, différenciation, évolution et l'approche de certaines pathologies. En effet, de très nombreuses protéines sont capables de se lier à l'ADN et interviennent dans les mécanismes de réplication, transcription et réparation.

En parallèle de ce type d'étude, il est possible d'investiguer les liaisons protéine/protéine pour comprendre certains mécanismes de réparation, en particulier les protéines se liant aux histones ^[157] mais nous nous limiterons ici aux interactions ADN/protéines.

Deux approches sont possibles :

- Soit l'étude des conséquences de ces interactions
- Soit l'analyse de l'interaction elle-même et l'identification de ces protéines de liaison à l'ADN

L'objectif de notre travail correspond davantage à ce deuxième item avec le piégeage des protéines impliquées dans la reconnaissance et/ou la réparation des lésions de l'ADN.

I ETUDE *IN VIVO* DES LESIONS OU DE LA REPARATION DE L'ADN

Ce chapitre ne sera pas approfondi car ces techniques, utilisables pour étudier la réparation chez des animaux de laboratoire ou dans des cellules en culture, ne répondent pas à notre problématique. Nous pouvons simplement citer :

I.1 Des méthodes indirectes

Le suivi dans le temps du taux de lésions présentes dans des tissus ou cellules après un stress génotoxique permet de connaître la vitesse de réparation des lésions créées par ce stress. Pour mesurer ce taux de lésions, on peut utiliser une des méthodes suivantes :

- COMET : électrophorèse de l'ADN de cellules isolées dans un gel permettant de mesurer les cassures double et simple brin ^[158]. L'utilisation d'enzymes de la BER pour traiter les pelotes d'ADN avant électrophorèse permet de rendre cette méthode spécifique de certaines lésions. L'utilisation d'un milieu alcalin permet de détecter également les sites alcali-labiles.
- LC-MS/MS : pour quantifier les dommages présents dans l'ADN ^[159]. Les différents nucléosides normaux ou lésés sont séparés sur une colonne chromatographique puis dirigés vers un spectromètre de masse où ils vont être ionisés par la source electrospray, et se retrouvent chargés positivement ou négativement. Ils entrent alors dans le premier quadripôle du spectromètre de masse qui ne laissera passer dans le second quadripôle que les nucléosides possédant la masse du nucléoside à étudier. Dans le second quadripôle, ils se fragmentent pour être ensuite quantifiés dans le troisième quadripôle.
- PCR médiée par ligation : permettant la cartographie des cassures monocaténares.
- Test ARP (aldéhyde reactive probe) : réaction chimique avec un groupement aldéhyde utile à la quantification des sites abasiques ^{[160] [161]}.

I.2 Des méthodes directes

- Réactivation de plasmides lésés : des cellules sont transfectées avec un plasmide codant pour un gène rapporteur comportant un dommage. L'activité de réparation est mesurée au microscope en fluorescence par l'expression du gène rapporteur, tel celui de la GFP.
- Synthèse d'ADN non programmée : en présence de thymidine tritiée qui sera incorporée durant la réparation par excision de nucléotides.

II ETUDE *IN VITRO* DES PROTEINES DE RECONNAISSANCE ET DE REPARATION DE L'ADN

Historiquement, les interactions entre ADN et protéines ont été étudiées à l'aide de méthodes génétiques (mutations dirigées), biochimiques et structurales fournissant des données qualitatives ou semi-quantitatives. La tendance aujourd'hui est d'obtenir des données quantitatives précises sur ces interactions et la vitesse de réparation.

Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux techniques permettant la recherche de ces « DNA damage-binding proteins », toutes les techniques de cristallographie et de spectrométrie RMN approchant les connaissances moléculaires de la liaison^[7] ne faisant pas partie de notre sujet d'étude. De même, nous nous focaliserons ici sur des oligonucléotides isolés et nous ne décrirons pas les analyses possibles des protéines de liaison à la chromatine ou à des structures en triple hélice^[162].

Enfin, nous n'aborderons pas les techniques calorimétriques permettant la détermination des constantes cinétiques des interactions ADN/protéine : ITC (Isothermal Titration Calorimetry) et DSC (Differential Scanning Calorimetry) sont des techniques utilisées pour des réactions dont les modifications de température peuvent être mesurées.

Les complexes ADN/protéines peuvent être étudiés à trois niveaux différents :

- Au niveau de l'ADN, le site de liaison peut être précisément défini avec la connaissance exacte de la ou les bases impliquées.
- Au niveau de la protéine, les acides aminés essentiels à la liaison peuvent être déterminés et il est possible d'étudier la structure tertiaire de la protéine et ses changements conformationnels.
- Au niveau du complexe lui-même, sa cinétique de formation et dissociation, sa stabilité et l'énergie d'interaction peuvent être mesurées.

Concernant l'interaction proprement dite, ce sont des liaisons hydrogène et des liaisons de van der Waals qui se forment entre l'acide nucléique et la protéine.

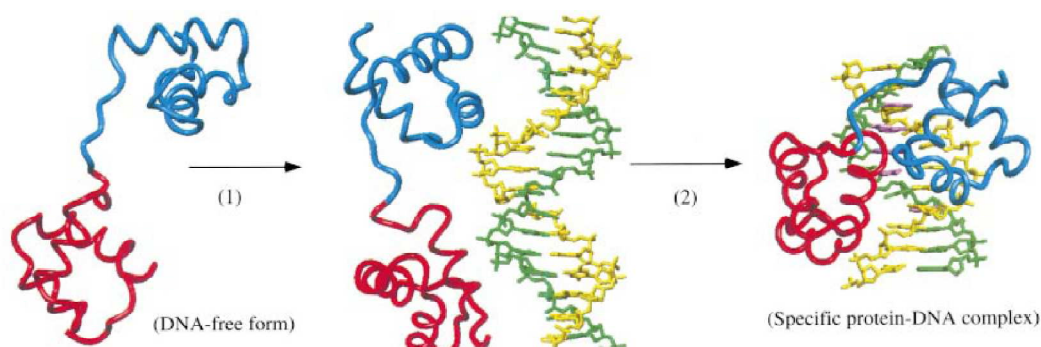


Figure 24 : Mécanisme proposé pour une interaction ADN/protéine
D'après Oda^[163].

- (1) : liaison non spécifique de faible affinité, de nature électrostatique.
- (2) : liaison spécifique de forte affinité, composée de liaisons hydrogène et de van der Waals

Nous nous focalisons ici uniquement sur les protéines de liaison à l'ADN.

Il existe des techniques d'étude de petites molécules synthétiques se liant à l'ADN ^[164] mais notre revue de synthèse se limitera aux molécules de nature protéique. Il est malgré tout difficile de traiter d'un sujet si vaste et d'aborder l'ensemble des protéines de liaison quel que soit le résultat de cette interaction. De plus, d'après Yaneva ^[165], il n'existe pas de méthode robuste pour la capture d'affinité de protéines se liant spécifiquement à l'ADN. Ces interactions dépendent de la translocation des protéines du cytoplasme vers le noyau et de leur affinité éventuelle pour les lésions de l'ADN ^[166]. Il semble évident que plusieurs techniques peuvent s'avérer complémentaires pour étudier une interaction donnée.

Ces interactions sont très variées et sans détailler ici l'ensemble des liaisons chimiques possibles, la revue de Luscombe *et al.* ^[167] décrit 54 familles structurales, ce qui illustre la grande diversité des structures chimiques directement impliquées dans l'interaction protéine/acide nucléique.

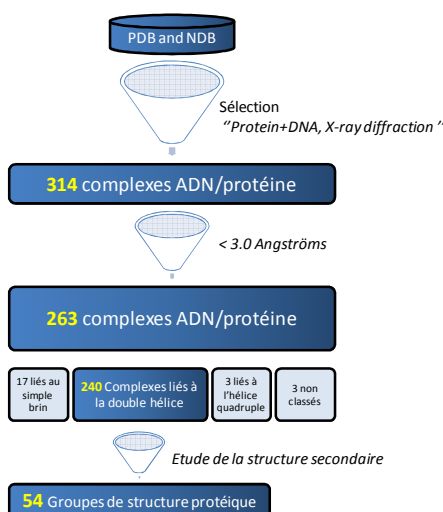


Figure 25 : Etude des complexes ADN/protéines
Selon ^[167].

PDB = Protein Data Bank, NDB = Nucleic Acid Database

II.1 Techniques avec marquage

II.1.1 Radioactivité

Il est possible de marquer l'ADN ou un polynucléotide assez facilement, notamment en utilisant un des isotopes du phosphore apporté par de l'ATP et fixé par des kinases ou des désoxynucléotides fixés par des terminale-transférases.

II.1.1.1 Filtration sur membrane

La première technique sur le plan historique est la filtration sur membrane, membrane à travers laquelle peuvent passer les acides nucléiques libres tandis que les protéines et les complexes ADN/protéines sont retenus ^[168]. L'approche est semi quantitative car elle utilise de l'ADN radioactif. Mais l'interprétation est difficile si plusieurs protéines sont à même de se lier à l'ADN.

II.1.1.2 Gel shift : EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay

Il s'agit d'une autre technique utilisant la radioactivité qui consiste en une migration électrophorétique d'oligonucléotides en gel de polyacrylamide non dénaturant.

L'utilité initiale de cette technique, en 1981, était de détecter les facteurs de transcription se liant à des séquences spécifiques de l'ADN ^[169]. Relativement simple et rapide, elle permet la séparation de l'ADN libre de l'ADN lié à des protéines grâce à leurs différences de mobilité sur un gel d'électrophorèse, l'ADN complexé aux protéines ayant une mobilité moindre. Si une molécule d'ADN propose plusieurs sites de fixation pour une protéine donnée, il se formera autant de bandes que de sites de liaison.

Méthode facile et versatile, elle est très sensible (10^{-18} mol d'ADN). Elle est utilisée pour des mesures quantitatives et cinétiques ^[170]. Tous les paramètres de l'interaction peuvent être étudiés, ainsi que l'influence des sels, du tampon, de la température...

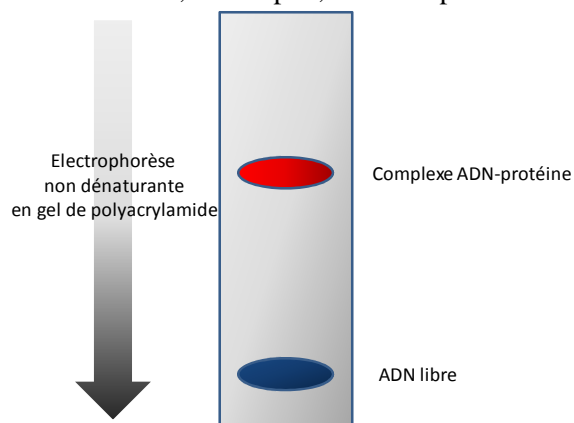


Figure 26 : Technique EMSA

Représentation schématique d'un gel de polyacrylamide utilisé pour une technique EMSA

Cette approche présente toutefois deux sources d'erreur potentielles : la dissociation possible du complexe durant l'électrophorèse et la liaison de protéines supplémentaires en fonction de la composition ionique du milieu. Un résultat semi-quantitatif est possible grâce à la mesure spectrophotométrique du gel. Depuis les années 80, cette technique s'est améliorée :

- ♦ En utilisant des oligonucléotides marqués au ^{32}P , la sensibilité est beaucoup plus importante

- ♦ En incubant le mélange ADN/protéine avec des compétiteurs de l'ADN, les réactions non spécifiques sont minimisées. En effet, les polymères synthétiques comme le poly(dI-dC) ont prouvé leur efficacité pour l'étude des protéines nucléaires^[171].

Méthode simple, efficace et largement utilisée pour étudier de telles interactions, elle est également rapide ; en effet, sur des mini-gels, la migration peut se dérouler en 30 minutes.

Lorsqu'un complexe est détecté, il est parfois possible de prouver la nature protéique du ligand avec l'action de protéases. Et s'il s'agit d'une protéine de reconnaissance d'une lésion de l'ADN, le complexe ne doit pas se former avec la sonde d'ADN sain. Il est évident que la découverte d'une protéine de liaison à l'ADN lésé ne prouve pas que cette protéine est impliquée dans le mécanisme de réparation. Néanmoins, cette approche a été très largement utilisée pour étudier les protéines de réparation de l'ADN.

Il est parfois possible d'identifier la protéine retenue par une analyse en spectrométrie de masse mais la visualisation d'un signal peut correspondre à une quantité insuffisante de protéines pour une identification ultérieure. De plus les informations obtenues avec le gel ne renseignent pas sur la nature de l'interaction^[172].

II.1.1.3 Analyse des coupures par électrophorèse

Cette technique d'analyse par électrophorèse sur gel d'acrylamide (EGPA) mesure l'activité des enzymes de la BER sur des oligonucléotides doubles-brins marqués portant une lésion. L'activité des enzymes se traduit soit par la formation d'un site abasique, soit directement par une coupure. Dans tous les cas, l'utilisation d'un tampon alcalin (généralement contenant de la pipéridine) transforme le site abasique en coupure. Une électrophorèse permet ensuite de reconnaître par leur petite taille, la formation des fragments par rapport à l'oligonucléotide intact. Sur la figure ci-dessous, nous constatons une coupure d'un site abasique par les enzymes de la BER :

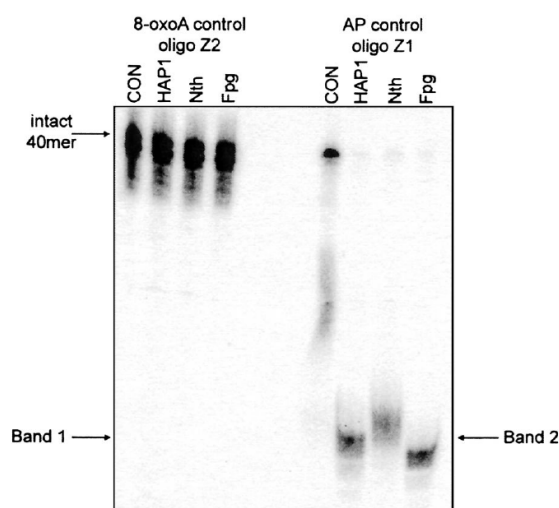


Figure 27 : Mesure des activités de coupure sur gel

Représentation de l'image obtenue par un phosphorimager des résidus d'oligonucléotides marqués portant soit une 8-oxoA (oligoZ2), soit un site abasique (oligoZ1) après mise en présence de différentes enzymes de la BER.

(CON = contrôle sans enzyme)

D'après^[107].

La quantification des signaux radioactifs obtenus permet un suivi des capacités de réparation des enzymes. Mais il est impossible d'accéder aux constantes et paramètres cinétiques caractéristiques de l'enzyme pour sa lésion.

La taille des fragments obtenus permet toutefois de préciser le mécanisme de coupure. Ainsi, l'incubation d'un oligonucléotide portant une lésion 5-hydroxyhydantoïne avec l'enzyme Fpg donne deux fragments indiquant une double coupure de la liaison phosphodiester en 5' et en 3' de la lésion par un mécanisme de β - δ élimination.

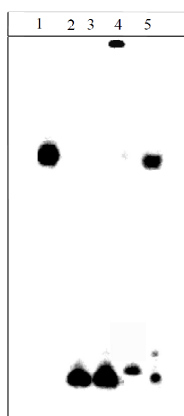


Figure 28 : Analyse des produits de coupure de deux enzymes

Image des produits de coupure après incubation d'un oligonucléotide 22mer duplex 5-OH-hydantoïne/Guanine avec les enzymes Fpg de *Lactococcus lactis* (Ll) et Fpg d'*E. coli* sur gel de polyacrylamide 15 % natif.

Piste 1 : oligonucléotide témoin ; Piste 2 : duplex + Fpg d'*E. coli*; Piste 3 : duplex + Fpg d'*E. coli* + pipéridine ; Piste 4 : duplex + Fpg Ll; Piste 5 : duplex + Fpg Ll + pipéridine.

Ces résultats suggèrent que les protéines Fpg reconnaissent le dommage ; il en résulte soit la formation d'un complexe de type ADN/protéine, (piste 4 en haut), soit la coupure de la lésion (observation de produits de coupure, pistes 2 et 3).

On note la présence d'une bande supplémentaire migrant rapidement en piste 5. Celle-ci n'était pas présente lors de l'incubation avec la protéine Fpg d'*E. coli*. Elle a disparu après un traitement en milieu pipéridine 1 M à 90 °C, pendant 5 min. Le traitement par la pipéridine à haute température a permis, d'une part de détruire le complexe, en libérant l'oligonucléotide 22mer duplex (observation d'une bande au niveau du témoin), et d'autre part d'induire une coupure de l'oligonucléotide par un mécanisme de $\beta\delta$ -élimination. D'après ^[173].

Souvent utilisée *in vitro* pour la mesure de réparation de lésions insérées dans des oligonucléotides synthétiques et traitées par des enzymes purifiées, cette méthode est également adaptée au suivi de la réparation d'ADN cellulaire, après extraction de ce dernier et post marquage radioactif.

II.1.1.4 Mesure du blocage de la réplication par une lésion (extension d'amorce)

En utilisant un oligonucléotide simple brin marqué portant la lésion, apparié à une amorce, on peut étudier la capacité de différentes polymérases à copier la zone d'ADN portant la lésion. Une lésion bloquante ne permettra pas de copier l'oligonucléotide matrice correspondant à la lésion et donc d'allonger l'amorce. En électrophorèse, on observera un oligonucléotide de taille identique à celui d'origine alors que l'extension d'amorce donnera naissance à un ADN double brin plus lourd.

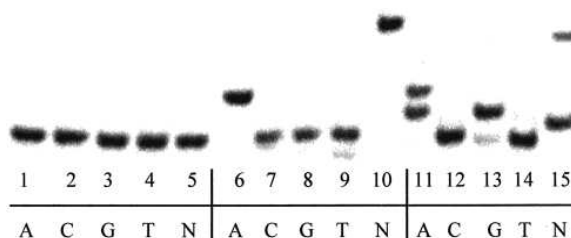


Figure 29 : Extension d'amorce d'un oligonucléotide lésé

L'oligonucléotide porte une lésion acide oxalurique.

Les enzymes utilisées sont : ADN polymérase β (1-5), Klenow fragment *exo⁻* (6-10), Taq ADN polymérase (11-15), mises en présence d'un oligonucléotide isolé (A, C, G ou T) ou d'un mélange des quatre (ligne N). D'après^[174].

II.1.1.5 Mesure des mutations

En utilisant un oligonucléotide identique mais non marqué et en réalisant une incubation préalable avec différents désoxynucléotides marqués et une ADN polymérase, on pourra identifier par chromatographie le risque de mutation par création d'un mauvais appariement.

II.1.1.6 Crosslinking induit

Des liaisons covalentes peuvent être créées artificiellement par des UV ou des agents chimiques entre un oligonucléotide radioactif et une protéine. Cette méthode produit exclusivement des adduits ADN/protéine et le point à souligner concerne la nature des interactions concernées qui sont uniquement des interactions spécifiques. Elle est largement utilisée pour déterminer des constantes d'affinité, même dans le cas de liaisons faibles. Un gel EMSA sépare ensuite les complexes spécifiques qui peuvent être découpés et élués du gel. Un exemple de cette application concerne les travaux de Rogacheva *et al.*^[66] qui ont permis d'identifier les groupements phosphates interagissant avec les protéines Fpg et OGG1.

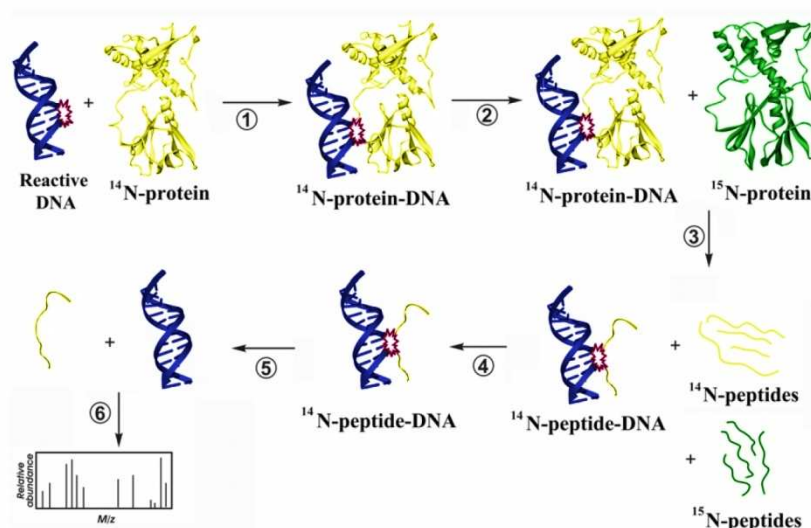


Figure 30 : Exemple d'application de crosslinking

D'après ^[66].

1 : crosslinking chimique entre l'ADN comportant la base 8-oxoG et la protéine Fpg non marquée

2 : addition de Fpg marquée (N¹⁵) mais non liée de façon covalente

3 : digestion par une protéase

4 : chromatographie pour isoler le complexe oligonucléotide-peptide

5 : hydrolyse de la liaison covalente

6 : identification par ESI-MS/MS

L'addition de Fpg marquée permet d'éliminer les peptides retenus par la chromatographie (étape 4) de par leur nature hydrophobe et non issus du couplage covalent.

II.1.1.7 Universal Protein Array (UPA)

Méthode décrite en 2000 ^[175], il s'agit d'une quantification des liaisons ADN/protéine à la surface d'une puce. Des protéines purifiées sont immobilisées sur une membrane de nitrocellulose (96 spots) et mis en contact avec des oligonucléotides doubles-brins radiomarqués pendant 12 heures à 4°C. Après plusieurs lavages, la surface est analysée par autoradiographie et l'intensité de chaque spot est proportionnelle à la quantité d'oligonucléotides liés. Il est précisé que la surface peut-être utilisée plusieurs fois et l'application mentionnée concerne le screening de protéines thérapeutiques en oncologie.

II.1.1.8 Southwestern Blotting

Cette méthode complémentaire permet d'approcher le poids moléculaire des protéines concernées. Des mélanges protéiques sont fractionnés par SDS-PAGE et les protéines sont transférées sur membrane sur laquelle elles entrent en contact, renaturées, avec des oligonucléotides marqués. Le problème principal de cette approche réside dans la présence de protéines dont la liaison à l'ADN n'est pas spécifique. Il est alors possible de bloquer la surface de la membrane de transfert avec de l'ADN de sperme de saumon ou des oligonucléotides type poly(dI-dC) ^[172]. Un autre inconvénient est que certaines protéines actives *in vivo* peuvent perdre totalement ou partiellement leur activité sur gel.

II.1.2 Fluorescence

II.1.2.1 Biopuces

Les biopuces à anticorps sont fabriquées en déposant des anticorps sur une lame de verre. Dans notre cas, les immunoglobulines concernées seraient des anticorps anti-« DNA binding protein ».

Les protéines de deux échantillons à comparer sont extraites, puis marquées avec soit du Cy3 soit du Cy5. Les deux échantillons sont ensuite déposés sur la puce à anticorps en quantité égale. Une compétition s'opère alors entre les protéines des deux échantillons pour se fixer sur l'anticorps spécifique de ces dernières. L'analyse conduit à la superposition de deux images obtenues après lecture, ces deux images correspondant à la fixation des protéines de chaque échantillon. La couleur indique le niveau de fixation des protéines.

Cette technique est très sensible et aussi très spécifique mais elle est coûteuse.

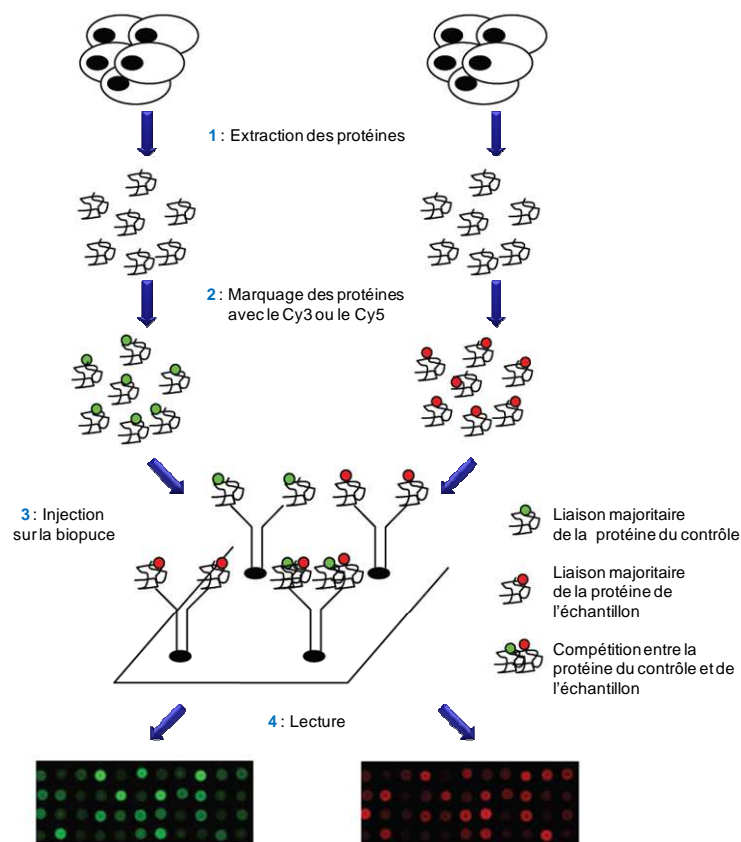


Figure 31 : Principe des biopuces à fluorescence
 D'après ^[87].

A la surface de la biopuce, d'autres interactions sont possibles, en remplaçant les anticorps par des oligonucléotides. Cette approche permet l'analyse simultanée de plusieurs paramètres de manière sensible, directe et quantitative.

Deux raisons expliquent la haute sensibilité :

- ♦ la concentration de la cible est importante
- ♦ le complexe se forme seulement sur le micro-spot engendrant un fort signal local ^[176].

Néanmoins, une mise en garde s'impose pour l'observation de phénomènes rapides comme des liaisons protéine/ADN instables car la dissociation du complexe ne doit pas perturber la lecture en fluorescence ^[177]. La cinétique de translocation de protéines sur des oligonucléotides lésés a été étudiée avec une imagerie de fluorescence ^[6].

Il est également possible de suivre **une activité de réparation** par une méthode fluorescente sur support. Sauvaigo *et al* ^[178] ont développé un test miniature *in vitro*, permettant de quantifier l'activité de coupure enzymatique de glycosylases sur des oligonucléotides lésés et marqués en 3' par une biotine. Ces substrats sont au préalable hybridés sur des sondes complémentaires, elles-mêmes fixées sur un support circulaire contenu dans les puits d'une microplaque (OLigo Sorbent Assay, OLISA). Une fois traités par les enzymes de réparation, les substrats sont analysés par fluorescence avec l'ajout d'un conjugué streptavidine-phycoérythrine. Si la glycosylase a clivé la lésion sélectionnée, on ne détecte alors aucun signal en solution, signe d'une activité enzymatique. Selon l'intensité du signal, la quantité d'enzyme ou d'extraits utilisée et la densité d'oligonucléotides fixés dans les puits, on peut en déduire les paramètres cinétiques de l'enzyme sur sa lésion.

II.1.2.2 Spectroscopie par fluorescence

Il s'agit de la mesure des fluctuations d'intensité de fluorescence de molécules en solution. La fluorescence intrinsèque des protéines, souvent modifiée par la liaison à l'ADN est mesurée, à la condition que les acides aminés concernés soient bien localisés sur le site de liaison à la protéine. Si ce n'est pas le cas, la technique est modifiée pour réaliser une compétition entre la protéine étudiée et une sonde fluorescente se liant à l'ADN.

Avec cette méthode, il est possible de suivre la formation de complexes sans restrictions spatiales, à la différence des puces immobilisant les molécules d'ADN et limitant la réaction dans l'espace ^[179].

II.1.2.3 FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

L'association spécifique entre une protéine et l'ADN peut provoquer la déformation de celui-ci. La détermination précise de cette déformation est importante pour la compréhension du rôle biologique de l'association. Elle peut être mesurée par FRET, avec des fluorophores placés aux extrémités du duplex d'ADN. Grâce à ce transfert entre fluorophores, il est possible de connaître

- ♦ la distance entre les extrémités du duplex et donc de modéliser la déformation du double-brin
- ♦ certaines caractéristiques énergétiques de la liaison ADN/protéine ^[180].

Cette approche a été envisagée au laboratoire lors de la thèse d'Alexia Chollat-Namy (2007) ^[28], mais dans un contexte différent, celui de la réparation. Il s'agit de l'analyse d'un substrat oligonucléotidique en forme d'« hairpin », ou épingle à cheveu, conçu pour l'étude des activités de réparation de l'ADN par les glycosylases de la BER, mesurées par le suivi de l'inhibition du « quenching » de fluorescence (dépôt d'une demande de brevet en 2002 par D. Gasparutto, J. Cadet, brevet FR2836926).

Un autre développement a été décrit par l'équipe de Madhusudan ^[181]. Il s'agit d'une méthode de dosage en plaque 96 puits sur lesquels sont immobilisés des oligonucléotides double-brin couplés à la fluorescéine et à une molécule de quencher. Ces molécules d'ADN

contiennent un analogue de site abasique. S'ils sont clivés par une enzyme, alors il y a émission de fluorescence. A l'inverse, en présence d'inhibiteurs, le signal de fluorescence n'est pas détecté.

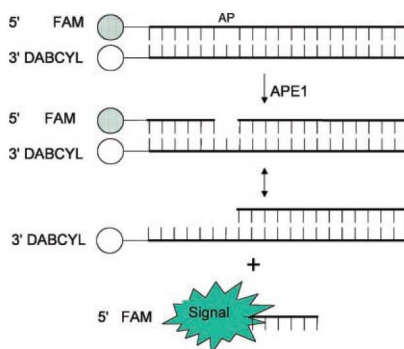


Figure 32 : Dosage de l'activité Ape1 par une technique de fluorescence

Un duplex d'ADN est marqué avec une molécule de fluorophore FAM à l'extrémité d'un brin et un quencher DABCYL à l'extrémité du brin complémentaire. La séparation de ces 2 molécules se produit lors du clivage du site abasique par Ape1. D'après ^[181].

II.1.3 Marquage photo-chimique

La formation d'une liaison covalente avec un groupe photoréactif permet de stabiliser un complexe ligand/protéine, même en conditions dénaturantes. Deux approches analytiques sont possibles :

- le complexe protéine/ligand est analysé par électrophorèse et permet l'identification de la protéine liée,
- le complexe est analysé par spectrométrie de masse après digestion peptidique et on accède ainsi à la structure moléculaire de la liaison.

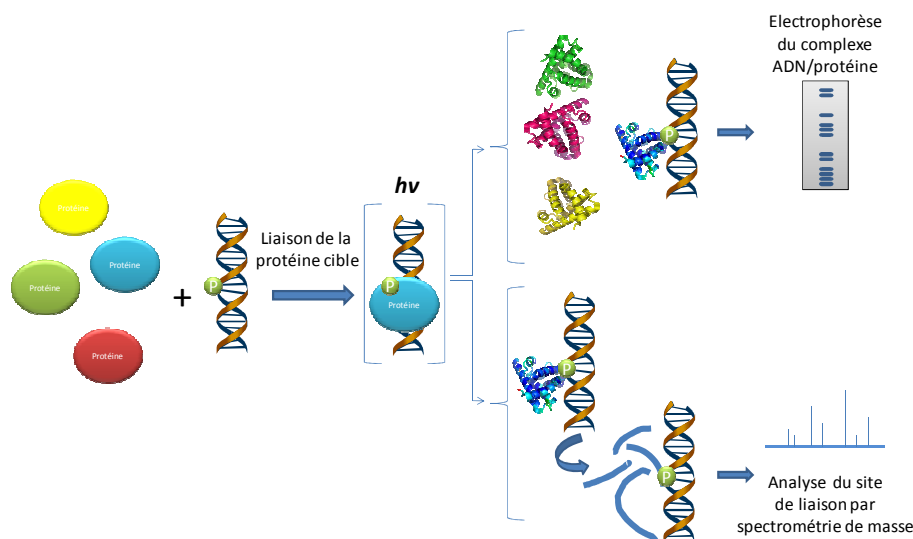


Figure 33 : Deux approches analytiques pour le marquage photochimique

Identification de la protéine ou de la structure du site de liaison avec l'ADN.

P = photophore. D'après ^[182].

Les applications de l'ADN photoréactif sont nombreuses, avec en particulier l'analyse des facteurs de transcription et de la structure de la chromatine ^[182].

II.2 Techniques de « Binding »

II.2.1 Immunoprécipitation

Cette méthode est habituellement utilisée pour la détection des lésions elles-mêmes. Nous pouvons citer l'exemple de la détection des dimères de thymine dans les kératinocytes avec un anticorps dirigé contre cette lésion UV-induite ^[183].

Ici, il s'agirait de l'utilisation d'un anticorps dirigé contre une protéine de liaison à l'ADN, en milieu liquide. Pour cette stratégie, l'épitope protéique reconnu par l'anticorps doit être accessible malgré la formation du complexe ADN-protéine.

II.2.2 Tag des protéines avec une séquence poly-histidine

Une séquence poly-histidine peut être insérée à l'extrémité N ou C terminale du polypeptide d'intérêt et son affinité avec les ions nickel immobilisés peut être utilisée pour l'étude d'interactions avec des oligonucléotides ^[184].

Il est également possible d'utiliser une réaction antigène-anticorps pour détecter ces protéines. Un exemple est l'application de Darain *et al.* ^[185] utilisant la modification d'impédance d'une électrode sur laquelle sont fixés des anticorps anti-histidine pour détecter la présence des protéines MutH et MutL. Récemment, une stratégie de screening du protéome de la levure a permis d'identifier des nucléases et des phosphatases ^[186].

II.2.3 Billes magnétiques

II.2.3.1 Billes fixées à des oligonucléotides dans le but de piéger une ou plusieurs protéines d'intérêt

Cette approche ne nécessite pas de sondes radiomarquées.

Des extraits protéiques nucléaires sont incubés avec des oligonucléotides double-brin biotinylés et des billes d'agarose/streptavidine. Le principe repose sur la très grande affinité de la biotine à l'avidine ($K_d = 10^{-15}M$).

La longueur de l'ADN biotinylé est comprise entre 20 et 500 paires de bases ^[123], et une attention doit être portée au problème potentiel d'encombrement stérique de l'ADN sur les billes, pouvant gêner l'accès des protéines.

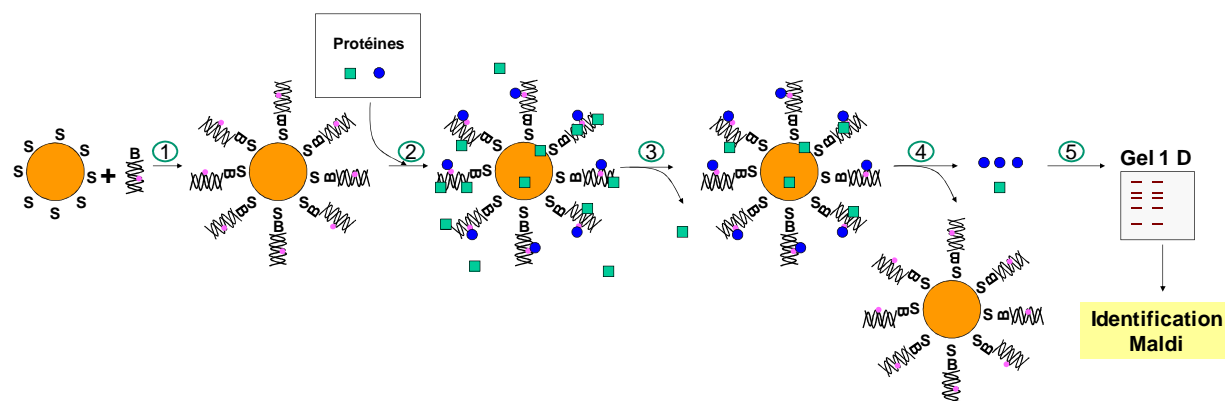


Figure 34 : Schéma simplifié pour l'utilisation de billes magnétiques recouvertes de streptavidine, liée à l'oligonucléotide biotinylé comportant une lésion (point rose).

1 : construction du complexe billes/ADN. S = streptavidine, B= biotine.

2 : ajout de protéines (extrait cellulaire)

3 : lavage ; seules les protéines liées à l'ADN ou à la bille sont retenues

4 : changement de force ionique (NaCl 1M) pour éluer les protéines

5 : électrophorèse en gel de polyacrylamide, découpe des spots pour identification en SM.

Cette technique s'applique pour des protéines purifiées et des extraits ^[187]. Le problème potentiel réside dans la présence éventuelle d'endonucléases et exonucléases.

Deux concepts sont soulignés par une publication de 2003 ^[165] :

- ♦ capture d'affinité (interactions très spécifiques)
- ♦ particules magnétiques (collecte facile sur un grand volume)

La spécificité de la liaison ADN/protéine dépend de deux facteurs :

- ♦ la longueur du site (idéal de 3 à 5 pdb)
- ♦ la longueur de l'espaceur ^[188]

Ces billes magnétiques peuvent aussi être déposées sur la cible d'un spectromètre de masse type MALDI pour l'identification des ligands sur l'ADN. Mais comme la résolution n'est pas optimale pour des protéines dont la masse est inférieure à 10 kDa, le complexe formé doit très souvent être soumis à l'action de la trypsine au préalable.

➤ L'inconvénient principal de cette approche est d'identifier de nombreuses protéines dont la liaison à l'ADN n'est pas spécifique puisqu'elle est le plus souvent de nature électrostatique.

De plus, nous avons constaté que certaines protéines ont la capacité de se lier à la bille elle-même (sans ADN). Ce phénomène pourrait être expliqué par la porosité des billes ^{[189] [190]}.

Yaneva et Tempest ^[191] proposent dans ce contexte des sélections négatives ou positives au préalable : compétiteur dI-dC, augmentation de la stringence...

➤ L'avantage principal de cette méthode est son adaptation possible à l'étude d'un grand nombre de lésions ; leur création directe sur l'ADN fixé à la bille est possible avec par exemple des rayons UV, une DNase,... ^[192].

II.2.3.2 Cas particulier d'utilisation des billes : purification du complexe ADN/protéine

a) Le test de trapping

Des stratégies existent pour piéger des intermédiaires de la réaction d'une protéine sur l'ADN, soit dans l'objectif d'analyser le mécanisme réactionnel, soit d'accéder à la structure moléculaire de la liaison. Le test de trapping avec la molécule NaBH_4 rentre dans ce cadre^[25]. Il peut également être utilisé pour piéger des enzymes comme les glycosylases/lyases.

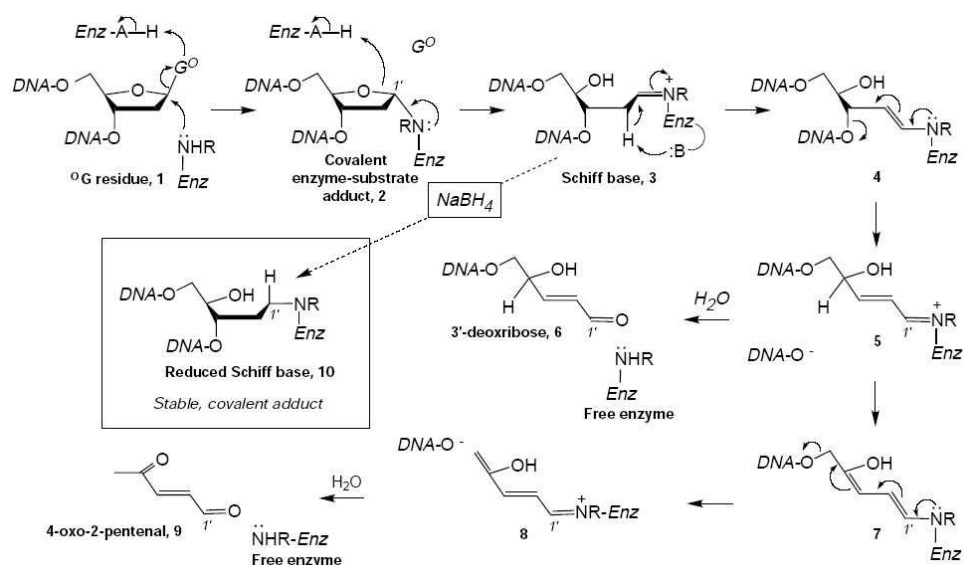


Figure 35 : Mécanisme d'action du NaBH_4
Selon Nash et al.^[8]

Des oligonucléotides biotinylés sont fixés sur des billes et les protéines sont mises en contact avec ces oligonucléotides en présence de NaBH_4 .

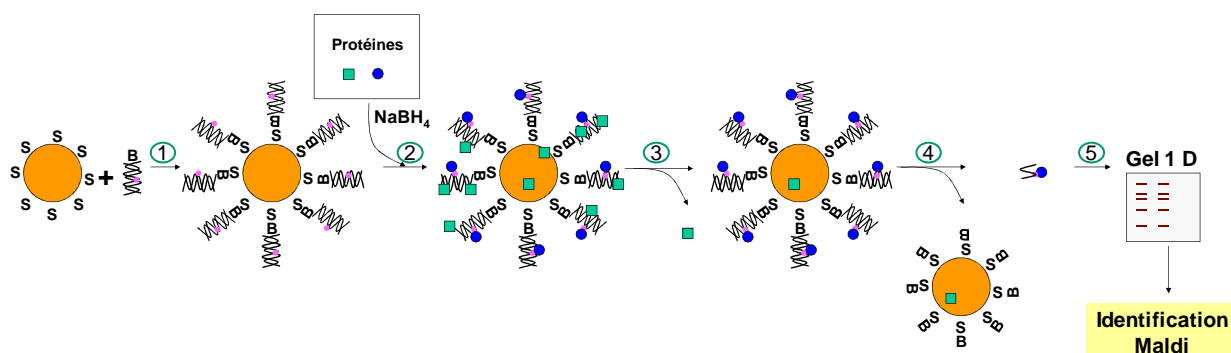


Figure 36 : Schéma simplifié pour l'utilisation du trapping avec billes magnétiques

1 : construction du complexe billes/ADN. S = Streptavidine, B = Biotine.

2 : ajout de protéines (extrait cellulaire) en milieu NaBH_4 (liaisons covalentes avec certaines protéines)

3 : lavage ; seules les protéines liées à l'ADN ou à la bille sont retenues

4 : action d'une DNase pour séparer la bille de l'ADN

5 : électrophorèse des complexes ADN/protéine et identification en SM.

Le test de trapping détecte un intermédiaire base de Schiff par lequel l'enzyme est liée à son substrat. Avec ce test, les glycosylases monofonctionnelles ne forment pas un intermédiaire base de Schiff, seules les enzymes bifonctionnelles -glycosylase et lyase- sont concernées [8]. L'action d'une DNase suivie d'une séparation électrophorétique permet d'isoler des protéines d'intérêt. Cette méthode permet d'étudier trois classes de protéines : les AP lyases, les protéines se fixant de préférence aux sites AP et les protéines contenant une fonction amine qui se lie à l'ADN [15].

b) Oligonucléotide conjugué à une molécule photo-réactive

Une stratégie originale a été décrite en 2007 [193] et qui consiste à lier l'oligonucléotide sur la bille à l'aide d'une molécule photoréactive qui, après irradiation UV, pourra être clivée.

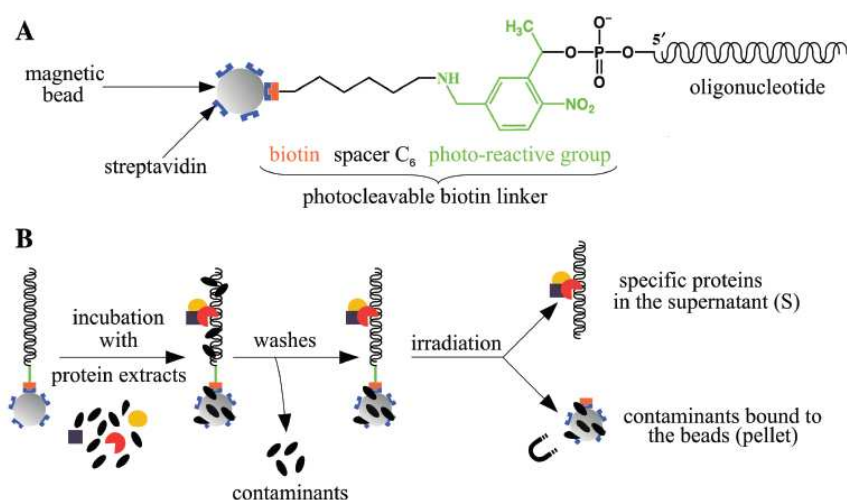


Figure 37 : Purification d'un complexe ADN/protéine à l'aide de billes magnétiques
D'après [193].

A : l'oligonucléotide est conjugué au groupement photoréactif, couplé lui-même à la biotine. Les billes magnétiques recouvertes de streptavidine sont incubées avec cette molécule.

B : purification des extraits protéiques, incubés avec les billes préparées lors de l'étape A. Après plusieurs lavages, le complexe ADN/protéine est photoclivé.

Cette stratégie présente l'avantage d'éliminer les protéines se liant de manière non spécifique sur les billes magnétiques.

II.3 Techniques de Footprinting

Ces techniques sont utilisées pour connaître la séquence précise d'ADN impliquée dans la liaison protéique. L'oligonucléotide d'intérêt est marqué à l'une de ses extrémités et mis en contact avec la protéine (purifiée ou contenue dans un mélange complexe). Le complexe est ensuite traité par un réactif enzymatique ou chimique qui clive partiellement l'ADN ; la protéine liée joue alors le rôle de protecteur vis-à-vis de cette dégradation. Les fragments obtenus sont étudiés par électrophorèse et autoradiographie.

Le réactif utilisé peut être :

- ♦ une enzyme : la plus utilisée est la DNase I. Mais sa taille ne lui permet pas d'accéder aux zones proches de la protéine liée. L'exonucléase III présente l'avantage de digérer tout l'ADN libre.
- ♦ un agent chimique : cette molécule a les capacités d'agir sur l'ADN mais la protéine peut également être la cible d'altérations. Le radical hydroxyle peut jouer ce rôle en oxydant la molécule de désoxyribose et en provoquant la cassure de l'ADN.

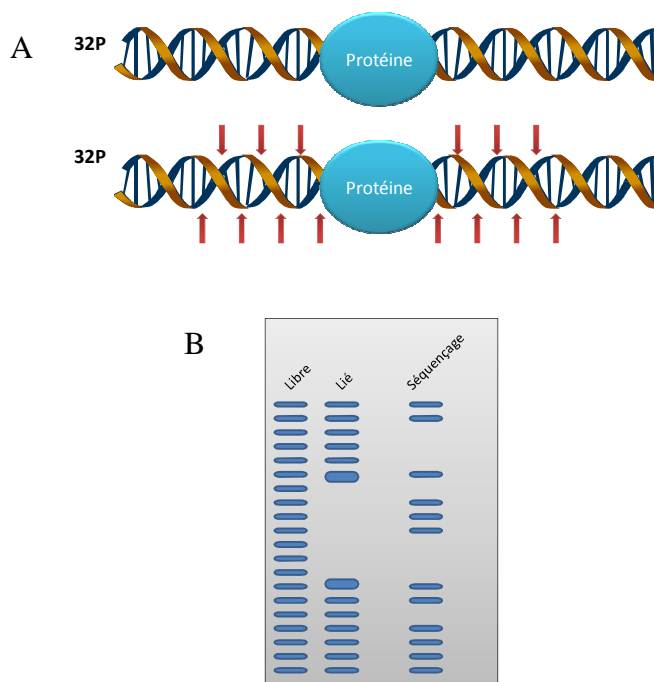


Figure 38 : Principe schématique de la réaction de Footprinting

A : Formation d'un complexe ADN/protéine sur un double brin radiomarqué suivie par l'action du réactif de footprinting (en moyenne une coupure par molécule d'ADN).

B : Séparation des fragments obtenus sur un gel de séquençage. La région protégée correspond à l'absence de bandes parmi les produits de digestion. D'après ^[172].

L'inconvénient majeur de cette technique réside dans l'équilibre de la réaction ADN/protéine. De l'ADN en excès va générer un bruit de fond gênant tandis que les protéines en excès peuvent se lier de manière non spécifique à l'ADN.

Une autre approche est maintenant très utilisée. La réaction de footprinting peut se dérouler sur un gel non dénaturant. Les complexes ADN/protéines de faible affinité peuvent ainsi être maintenus dans le gel.

Mais dans tous les cas, ces techniques se déroulent *in vitro* et l'interaction peut être artéfactuelle ou absente si les conditions ioniques ne sont pas optimales ou les cofacteurs absents. Il existe une technique de « footprinting *in vivo* » à partir de cellules traitées avec le diméthylsulfate ^[172].

Une approche alternative et complémentaire est de modifier les bases impliquées dans cette interaction de manière à empêcher ou limiter la liaison de la protéine. Nous obtenons ici une mesure directe de la contribution de chaque nucléotide et même la nature précise des contacts intermoléculaires.

Une variante de cette technique a été imaginée par l'équipe de Barker ^[194]. Les protéines liées de manière covalente à l'ADN sont supposées perturber la réplication, la réparation, la transcription...(comme certains médicaments anticancer). A partir de cellules CHO, leur objectif est d'isoler ces protéines liées à l'ADN. Ils utilisent un détergent commercial (DNAzol[®]) qui possède la propriété de lyser les cellules, hydrolyser l'ARN et dissocier les complexes non covalents. L'ADN génomique est d'abord isolé avec ce détergent puis les complexes extraits sont traités avec la DNase I. L'identification protéique est ensuite possible par spectrométrie de masse.

II.4 Protéomique

Le protéome est l'ensemble des protéines présentes dans une cellule ou un tissu. Deux groupes de techniques peuvent être abordés ici : l'électrophorèse bidimensionnelle et la chromatographie.

II.4.1 Electrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse 2D est une séparation de protéines, après leur dénaturation, selon leur point isoélectrique (isoelectrofocalisation) et leur masse moléculaire (SDS PAGE) ^{[195] [196]}.

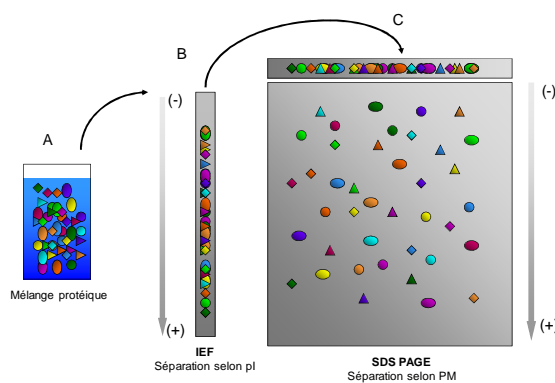


Figure 39 : Principe de la réalisation d'une électrophorèse bidimensionnelle

A : mélange protéique initial

B : Isoélectrofocalisation

C : Electrophorèse SDS PAGE

L'étape suivante est la révélation des protéines présentes par coloration du gel.

Les gels colorés sont ensuite scannés et des logiciels commerciaux permettent l'analyse des images obtenues. Nous pouvons citer comme exemples : ImageMaster[®] (Amersham Biosciences), Melanie 3[®] (GeneBio), Progenesis[®] (Nonlinear Dynamics), PDQuest[®] (Bio-Rad laboratories)... Certains d'entre eux peuvent interagir avec un système robotique qui découpe les spots d'intérêt dans le gel, afin de les analyser en spectrométrie de masse.

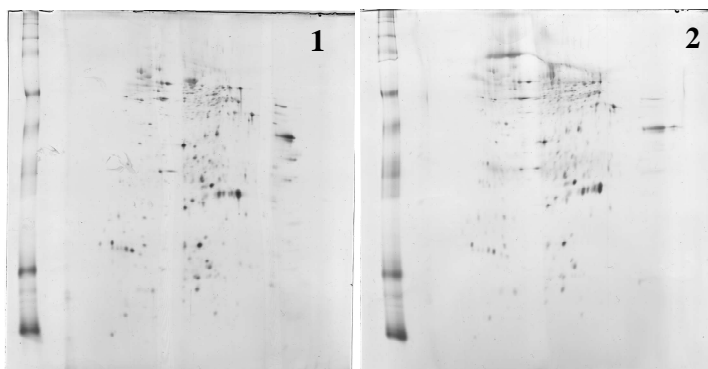


Figure 40 : Exemple d'électrophorèse bidimensionnelle

obtenue avec 750 µg de protéines d'extraits nucléaires de cellules Hacat mis en contact avec 75 pmol d'oligonucléotides sans lésion (1) ou avec lésion (2) sur billes magnétiques Dynal. L'éluat a été réalisé avec du tampon KCl 1M. L'éluat subit un déssalage puis une IEF en pH 3-10 (50 000 Vh) puis une migration SDS PAGE en gel homogène à 12%.

Les techniques de coloration à l'argent rendent possible la détection de plus de 3000 spots sur un gel. Une coloration fluorescente (Sypro Ruby) permet la même sensibilité que celle de la coloration à l'argent mais la coloration est beaucoup plus proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans chaque spot ^[197].

Tableau VI : Techniques de révélation des taches protéiques sur gel de polyacrylamide

Méthodes de coloration	Sensibilité (quantité minimale de protéine détectable par tache en nanogramme)
Rouge Ponceau	100
Bleu de Coomassie	40
Argent	4
Or colloïdal	<1

Les étapes de solubilisation des protéines sont essentielles pour la réalisation de ces gels ^{[198] [199]} car les protéines à analyser doivent :

- ♦ être extraites du milieu biologique
- ♦ être isolées des substances pouvant interférer avec la technique analytique
- ♦ rester en solution pendant toute la séparation

Le principal problème de cette visualisation protéique est la diversité chimique des protéines : poids moléculaire, point isoélectrique et solubilité ^[196].

Elle nous permet d'une part une analyse différentielle et d'autre part d'identifier ensuite les protéines d'intérêt par une protéolyse dans le gel suivie d'une extraction peptidique, à la condition que la coloration utilisée soit compatible avec l'analyse en spectrométrie de masse ^[200].

L'avantage réside dans l'approche de l'analyse d'extraits cellulaires complets, sans connaissance préalable de leur composition. A l'inverse, le choix des critères de migration (gammas pI et PM) sélectionne artificiellement une catégorie de protéines. De plus, l'incidence des comigrations de protéines est importante^[201] et compromet souvent l'analyse ultérieure.

Cas particulier : Technique DIGE : Difference Gel Electrophoresis

Il s'agit également de l'analyse de gels 2D mais afin d'éliminer tout biais analytique lié à la faible reproductibilité du gel, chaque échantillon est marqué avec un fluorochrome différent et une comigration est réalisée.

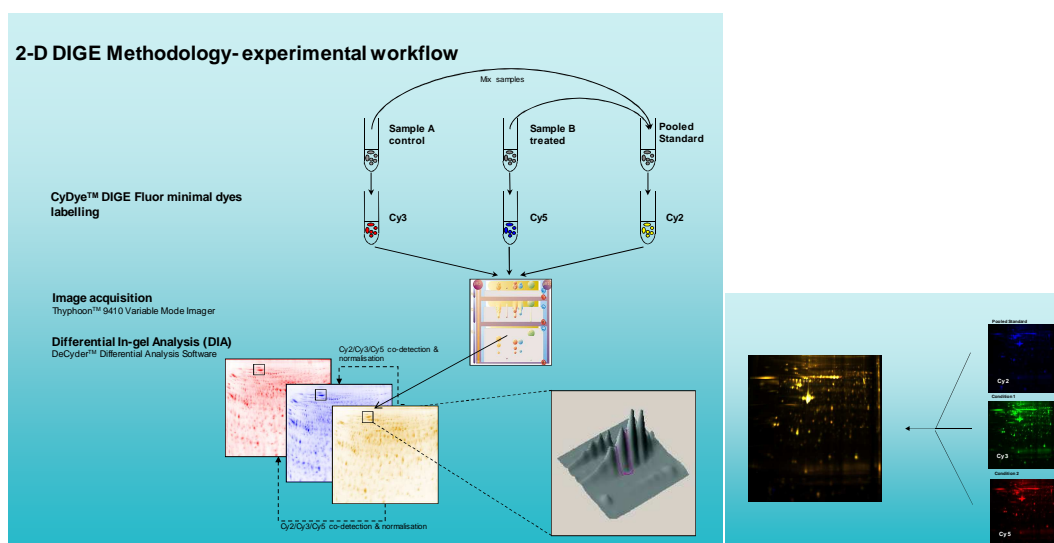


Figure 41 : Schéma explicatif de la technique DIGE

(GE Healthcare). Les 2 échantillons à comparer sont marqués avec 2 fluorochromes différents et un 3^e fluorochrome est utilisé pour le mélange des 2 échantillons (standard interne). Le gel obtenu après électrophorèse bidimensionnelle est scanné et l'analyse utilise la superposition des images pour observer les spots différentiels. A droite, un exemple d'image obtenue avec des extraits lymphocytaires humains.

Cette méthodologie améliore la reproductibilité, la sensibilité et l'aspect quantitatif^[202].

II.4.2 Surface Enhanced Laser Desorption Ionization : SELDI

La première utilisation de la technologie SELDI pour l'étude des interactions ADN/protéines date de 2002^[203] et a été identifiée sous l'acronyme DACA (DNA Affinity Capture).

Avec cette approche, nous pouvons aborder le principe de la chromatographie d'affinité qui sera également appliqué ultérieurement pour d'autres dispositifs. Il s'agit de la séparation de protéines basée sur les interactions spécifiques entre des ligands immobilisés et les protéines cibles.

Il est important de préciser que ce principe de chromatographie d'affinité peut être couplé à d'autres techniques, comme celle que nous venons de voir au chapitre précédent. Par exemple, avant la séparation des échantillons par électrophorèse bidimensionnelle, la

séparation d'affinité est utilisée pour la préconcentration et le prétraitement des mélanges complexes ^[204]. Elle permet :

- le retrait d'une protéine ou d'une classe de protéines qui interfère avec les analyses ultérieures
- la concentration de protéines de faible abondance
- la classification de protéines totales en plusieurs groupes en fonction de leur structure chimique.

Ces étapes chromatographiques sont très largement appliquées avant les séparations électrophorétiques et les analyses en spectrométrie de masse.

La technologie commercialisée par la société Ciphergen permet une rétention sélective de molécules à la surface d'une « chip » constituée de barrettes présentant des spots avec des propriétés chimiques différentes (ioniques, hydrophobes, hydrophiles...) ou fonctionnalisées avec des sondes biologiques (ADN, anticorps, récepteurs,...).

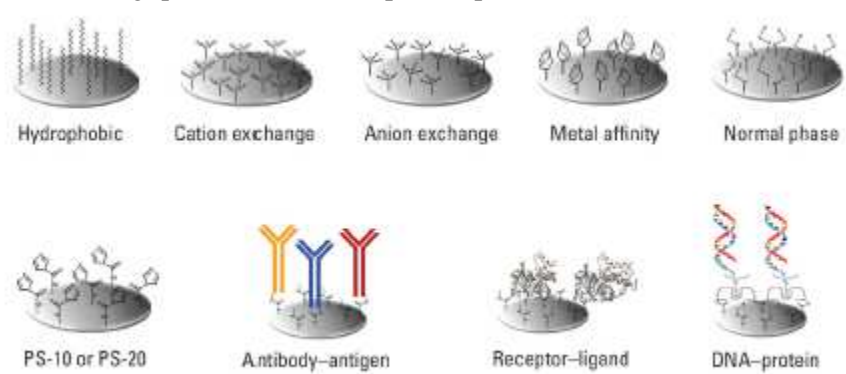


Figure 42 : Surface de la puce utilisée avec la technologie SELDI

Chaque barrette est composée de 8 ou 16 spots de 2 mm de diamètre dont la nature de la surface chromatographique est définie par l'utilisateur.

Après application d'un échantillon sur la puce, la barrette est insérée dans un lecteur SELDI pour analyser les molécules capturées. Des protéines de grande taille (>60kDa) peuvent être détectées. Seulement 5000 cellules sont nécessaires pour une analyse ^[205], voire 500 ^[206].

Cette approche est plus informative qu'une chromatographie classique et permet de s'affranchir des contraintes des gels bidimensionnels vis-à-vis des protéines hydrophobes, très acides ou très alcalines ^[207]. Néanmoins, non reliée à un spectromètre de masse, elle ne permet pas l'identification des protéines d'intérêt ^[203] et beaucoup de tampons sont compatibles avec le SELDI et incompatibles en spectrométrie de masse classique ^[208].

De plus, la spécificité de la liaison protéine/ADN n'est pas forcément établie car de nombreuses interactions non spécifiques peuvent avoir lieu. Enfin, la quantité de protéines présentes dans l'échantillon peut également être un facteur limitant, comme lors de l'étude réalisée sur les facteurs de transcription, ne représentant que 0,01 % des protéines nucléaires totales ^[166].

II.5 Méthodes optiques

Les deux méthodes citées ci-dessous peuvent mesurer des interactions très rapides en temps réel, mais la deuxième (SPR) est la plus utilisée de part l'analyse simultanée de plusieurs interactions ^[209].

II.5.1 Spectrophotométrie en flux stoppé

Cette technique est une mesure de la modification d'absorbance en fonction du temps. Les molécules sont libres en solution et une catégorie d'entre elles est marquée avec un fluorochrome. Il est également possible d'utiliser la fluorescence intrinsèque d'un acide aminé, comme le tryptophane par exemple. Cette approche a été utilisée récemment pour étudier les conformations de l'enzyme Fpg lors de son processus catalytique avec une base oxydée, la 8-oxoG ^[210].

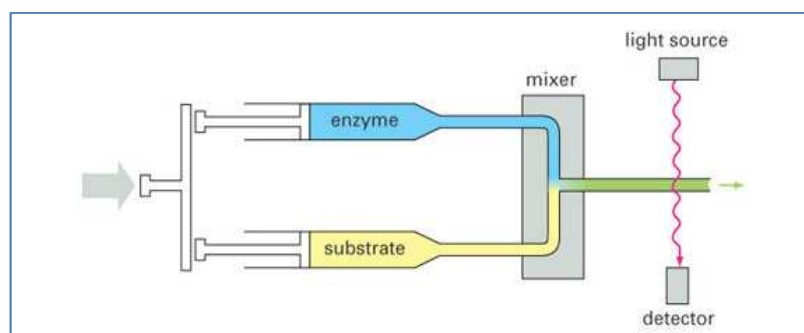


Figure 43 : Représentation simplifiée d'un spectrophotomètre en flux stoppé
D'après ^[211]. L'intervalle de temps entre 2 spectres d'absorption (ou d'émission) est de l'ordre de 1 msec.

II.5.2 Résonance Plasmonique de Surface : SPR

L'analyse d'interactions biomoléculaires avec cette technique est appelée BIA (Biomolecular Interaction Analysis). Il s'agit d'une technique optique dans laquelle la liaison d'un analyte sur la surface change l'indice de réfraction à l'interface surface/solution. Les interactions moléculaires sont analysées en temps réel sans étape de marquage.

L'utilisation de la SPR pour l'étude des interactions ADN/protéine a débuté en 1993 ^[212]. Elle permet non seulement d'étudier des interactions à partir de protéines purifiées ^{[213] [179] [214]} mais aussi à partir de mélanges protéiques complexes dans les extraits cellulaires ^[215]. L'idée est de permettre le screening de protéines interagissant de manière spécifique avec une séquence déterminée d'acides nucléiques.

La première machine commerciale utilisant cette technologie existe depuis 1990 sous le nom de BIAcore. Les 4 cellules de mesure permettent la mesure d'interactions avec 4 ligands différents en même temps. L'avantage principal de cet instrument est de calculer des constantes cinétiques d'association et de dissociation pour les interactions étudiées.

C'est une approche similaire que nous avons choisie dans notre étude mais avec la possibilité de comparer davantage d'interactions. Notre choix s'est porté sur la **SPRi** (par imagerie) qui permet l'observation de nombreuses réactions parallélisées sur une même puce et nous détaillerons l'originalité du dispositif dans le troisième chapitre.

II.6 Spectrométrie de masse

II.6.1 Utilisée de manière indépendante

Nous ne détaillerons pas ici l'ensemble des technologies utilisées. Une revue très complète reprend l'ensemble des dispositifs existants ^[216]. Si celui-ci ne comprend qu'une seule étape de spectrométrie de masse, on peut distinguer deux technologies principales :

❶ MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight

Méthode utile pour l'analyse de peptides ou de protéines. L'échantillon est co-cristallisé avec une matrice absorbant l'énergie des photons d'un rayon laser. Les ions obtenus sont injectés dans le spectromètre de masse et séparés selon leur masse. Les masses moléculaires des peptides représentent l'empreinte de la protéine initiale. L'identification protéique est obtenue en confrontant ces informations à des bases de données spécifiques. La limite de détection dépend de la protéine à identifier mais elle peut atteindre l'ordre de grandeur de la picomole ^[217].

❷ ESI-MS : Electrospray Ionization-Mass Spectrometry

L'application d'un gaz sur un échantillon liquide provoque son évaporation et la formation d'un aérosol. Chaque espèce moléculaire apparaît sous de multiples formes chargées ; accélérées dans le champ magnétique, elles atteindront le détecteur selon leur masse.

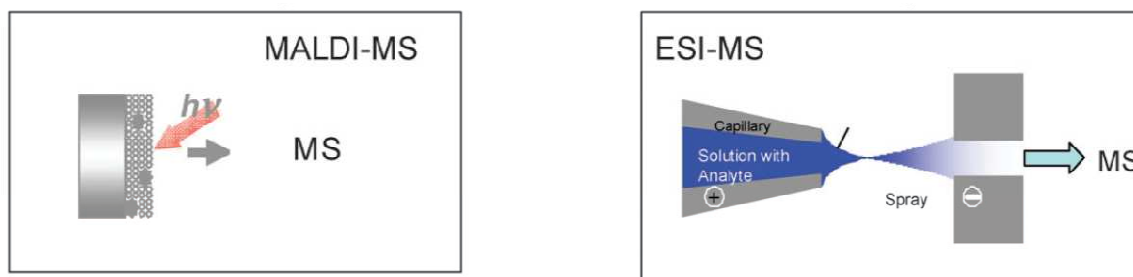


Figure 44 : Représentation schématique de 2 techniques de spectrométrie de masse
D'après ^[218].

Mais la spectrométrie de masse isolée n'est pas une technique quantitative car l'intensité du signal dépend de la composition chimique des protéines et de la matrice utilisée. L'intensité du signal d'un peptide ne reflète pas la quantité de peptides de l'échantillon ^[219].

La technologie ICAT (Isotope-Coded-Affinity-Tag) est une approche quantitative mais à ce jour peu utilisée pour l'étude des interactions ADN/protéine. Une seule publication a mis en évidence une protéine se liant au gène promoteur de la créatine kinase musculaire ^[220].

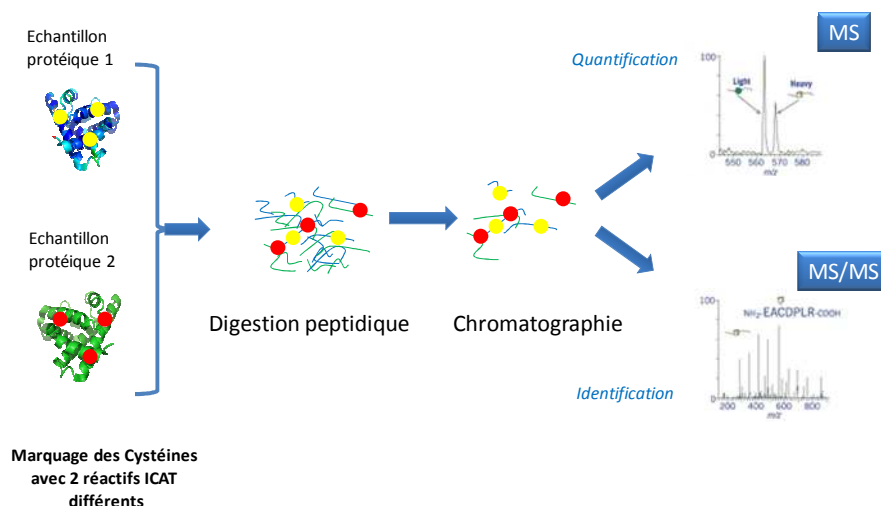


Figure 45 : Principe de la technique ICAT

Deux échantillons protéiques peuvent être comparés grâce à un marquage différent. Le mélange des 2 échantillons est séparé par chromatographie afin d'isoler les fragments peptidiques marqués puis analysé par spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse en tandem nécessite un appareillage plus complexe et plus coûteux mais présente une puissance analytique supérieure. La LC-MS/MS à elle seule est intéressante pour l'analyse de mélanges complexes. Une chromatographie liquide concentre et sépare les peptides présents dans le mélange. Après leur élution, ils sont ionisés et analysés par spectrométrie de masse. Le ou les peptides d'intérêt sont sélectionnés grâce à leur rapport masse/charge, puis fragmentés (le premier analyseur est utilisé comme filtre de masse). Une seule analyse offre la possibilité d'isoler et de séquencer plusieurs centaines de peptides d'un échantillon. La limite de sensibilité approche la femtomole.

II.6.2 Utilisée de manière couplée à une autre technologie

La spectrométrie de masse peut être utilisée dans un 2^e temps, après une première capture des protéines d'intérêt. C'est l'exemple de SELDI-MS et BIA-MS ^[208].

❶ Avec le SELDI-MS, il est possible de déterminer la masse moléculaire de protéines précédemment capturées. Des profils protéiques reproductibles peuvent être obtenus à partir de fluides biologiques intéressants en protéomique clinique, à condition de disposer d'un grand nombre d'échantillons permettant l'obtention de résultats fiables ^[221] et d'algorithmes bioinformatiques sophistiqués ^[222].

❷ Un autre couplage a été décrit ; SPRi couplée à une analyse directe par SELDI-MS. Cette approche a été comparée à la technologie BIAcore suivie de LC-MS ^[223] et a permis l'identification de protéines nucléaires. Une stratégie intéressante a également été décrite en 2004 ^[224] pour étudier un récepteur de cellules T humaines ; des résultats ont été obtenus à partir de l'immobilisation d'un oligonucléotide sur des billes magnétiques, puis sur une puce SELDI et enfin sur une surface SPR élue pour une analyse en ESI-MS.

❸ Nous nous focaliserons ici sur l'analyse en **BIA-MS** : spectrométrie par résonance de surface couplée à la spectrométrie de masse car il s'agit d'une perspective possible pour notre projet. Cette approche combinée existe depuis 1997^[225]^[226] et permet l'identification des molécules dont les interactions sont observées en temps réel. L'idée est d'utiliser la surface du prisme de la SPR comme système de micropurification par affinité puis de collecter les molécules ayant interagi pour les identifier en spectrométrie de masse. La commercialisation du système BIAcore 3000® a permis l'identification de molécules partenaires au sein de complexes protéiques. L'identification protéique est obtenue après digestion tryptique, analyse des peptides en spectrométrie de masse puis recherche dans les bases de données. Cette stratégie comporte moins d'étapes manuelles que les méthodes conventionnelles comme la chromatographie d'affinité ou l'immunoprécipitation ; ceci permet de limiter les pertes d'échantillon et améliore la sensibilité^[227].

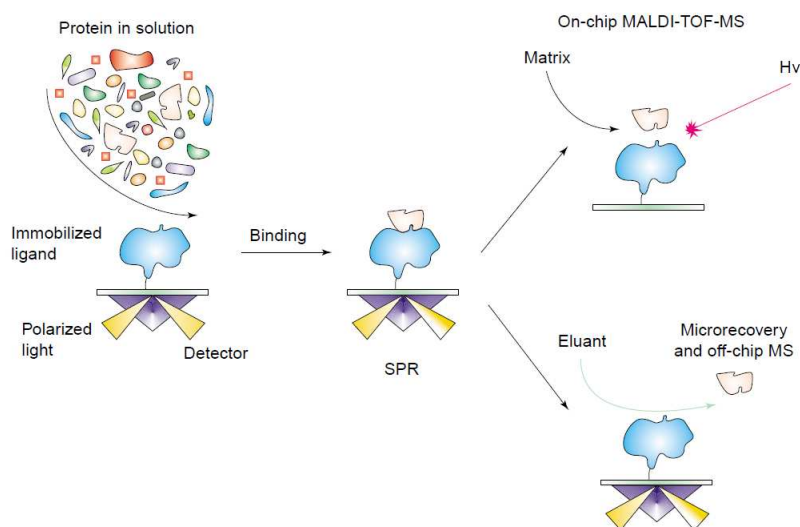


Figure 46 : Surface Plasmon Resonance Mass Spectrometry

D'après^[228].

Un ligand (ADN par exemple) est lié de manière covalente à la surface d'un prisme. Après injection d'un mélange de protéines, les interactions sont suivies par SPR. Les protéines d'intérêt (liées à l'ADN), peuvent être analysées soit par le retrait de la puce et l'application d'une matrice pour étude en MALDI-TOF, soit par une élution et une analyse en ESI-MS à la sortie du dispositif

Comme les autres techniques de détection optique, nous avons vu que la SPR renseigne sur la quantité totale de biomolécules retenues à la surface de la puce. Mais en cas de liaisons multiples, elle ne différencie pas la liaison d'un ou plusieurs analytes sur le ligand, elle n'informe pas non plus sur la nature des molécules d'intérêt^[229]. La nature des molécules concernées par les interactions non spécifiques reste inconnue.

Le couplage avec la spectrométrie de masse type MALDI-TOF permet de collecter davantage d'informations. Il est envisageable car :

- ♦ L'analyse en SPR est non-destructive
- ♦ La surface de rétention (sur le prisme) peut être facilement convertie en cible MALDI avec l'application d'une matrice.

II.6.2.1 *Premier cas : analyse directe sur le prisme*

Les molécules d'intérêt peuvent être piégées, non éluées et directement analysées en spectrométrie de masse ; cette approche nécessite de stopper la machine dès la fin de la phase d'association, de retirer le prisme et de le recouvrir de matrice pour spectrométrie de masse MALDI. Ce type d'analyse à la surface de la puce sera informative sur la nature des espèces moléculaires liées de manière non spécifique au ligand et permettra de valider ou non l'ensemble des étapes du protocole d'analyse, en particulier les lavages ^[226]. La surface du prisme peut ici être considérée comme une zone de micro-affinité sur laquelle les analytes sont concentrés ^[229].

Les avantages à souligner sont :

- la caractérisation des interactions transitoires (nécessitant des ions calcium par exemple)
- l'utilisation possible de mélanges protéiques complexes
- la sensibilité comprise entre 60 et 100 fmol d'après ^[230]. Une approche améliorée grâce à une micro-élution automatique proposée par l'équipe de Lopez *et al* sur un appareil Biacore permet même d'atteindre une sensibilité comprise entre 10 et 20 fmol de protéine isolée d'un extrait cytosolique complexe ^[227].

Plusieurs sociétés ont développé des instruments SPR capables d'analyser par MALDI-MS une dizaine ou une centaine de spots : Biacore, HTS Biosystems, GWC Instruments, Graffinity ^[228]. Il est même possible d'étudier simultanément des protéines se liant spécifiquement à deux ligands différents sur la même puce ^[231] et la résolution spatiale des spots est préservée durant l'application de la matrice.

Les limites d'une analyse MALDI concernent toutefois

- ♦ les protéines de grande taille, supérieure à 65 kDa et les modifications post-traductionnelles qui vont perturber l'identification des protéines d'intérêt.
- ♦ la destruction de la puce ; il est nécessaire de pouvoir recueillir suffisamment de matériel en un seul cycle.

II.6.2.2 *Deuxième cas : analyse après élution*

La possibilité d'éluier les molécules retenues lors de la SPR est une alternative intéressante dans la mesure où la puce peut ensuite être réutilisée. Mais la difficulté principale rencontrée en analyse ESI-MS/MS est un problème quantitatif car les échantillons élués ne fournissent pas une intensité de signal suffisante. Il est envisageable de répéter plusieurs fois la procédure d'élution mais la perte de matériel d'intérêt est inévitable.

II.6.2.3 Troisième cas : séquençage par spectrométrie de masse en tandem

Le séquençage des acides aminés peut répondre à cette double problématique si on le couple à une analyse SPR. Natsume *et al.* ^[232] ont donc développé une méthode de digestion et de séquençage « on-line ».

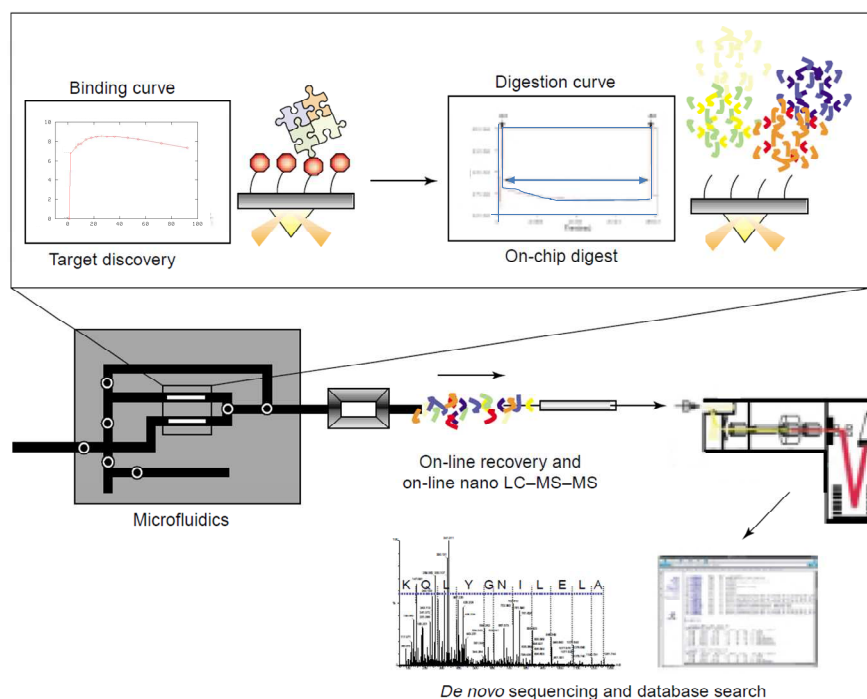


Figure 47 : Exemple de fonctionnement de la SPR couplée à la LC-MS/MS

La protéolyse a lieu sur les protéines fixées sur la puce. La cellule est ensuite chauffée pour permettre la digestion enzymatique. Le mélange peptidique est injecté dans une colonne chromatographique et ensuite analysé par ESI-MS/MS. D'après ^[232].

L'enzyme protéolytique est injectée directement dans la cellule d'analyse à 37°C et le flux est stoppé. La digestion complète indiquée par un signal du sensorgramme indique le moment de réinitialisation du flux. Afin de minimiser le risque de perte d'échantillon, le mélange peptidique est concentré dans une colonne capillaire. L'analyse ESI-MS/MS peut alors commencer.

Une publication récente ^[189] montre l'extraction de protéines humaines se liant à des nucléotides cycliques grâce à cette nouvelle technologie.

L'intérêt à souligner est la combinaison d'une technique de quantification et d'une analyse qualitative ^[229].

Parmi l'ensemble des techniques listées dans ce chapitre, nous avons initialement choisi les méthodes d'analyse protéomique avec l'électrophorèse bidimensionnelle et la stratégie des billes magnétiques. Face aux difficultés rencontrées, en particulier l'absence de reproductibilité des résultats, nous avons imaginé un concept similaire avec une biopuce comportant des oligonucléotides et l'analyse des interactions ADN/protéine par une méthode optique, la SPRi ; c'est l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE III

PRINCIPE SPRI ET RESULTATS

Depuis une vingtaine d'années, la résonance plasmonique de surface (SPR) est considérée comme un outil de recherche dans le domaine pharmaceutique, le contrôle qualité alimentaire, le contrôle de l'environnement et les analyses cliniques. Elle a été conçue pour analyser en temps réel les interactions entre macromolécules. Cette technologie permet en effet l'étude des interactions entre deux partenaires moléculaires dont l'un est immobilisé sur un support, l'autre étant perfusé à débit constant.

Elle est utilisée pour étudier de multiples interactions ^[233] :

- ADN/ADN ^[234]
- ARN/ADN ^[235]
- Protéines/ADN ^[236]
- ARN/protéines ^[237]
- Antigène/Anticorps ^[238]
- Sucres/protéines ^[239].

L'avancée technologique la plus importante est la **SPR par imagerie (SPRi)** ou SPR « microscopique » qui couple la sensibilité des mesures avec les capacités spatiales de l'imagerie. Elle est basée sur la modulation de l'intensité d'une lumière monochromatique incidente p-polarisée, à angle fixe. Deux avantages importants par rapport à la SPR classique :

- La capacité de visualiser la surface complète de la biopuce en temps réel
- La possibilité d'analyser plusieurs interactions moléculaires en continu et simultanément

I PRINCIPE

La résonance des plasmons de surface peut être considérée comme une oscillation collective des électrons libres du métal à l'interface entre ce métal et le milieu diélectrique. Cela se traduit par une chute de la réflectivité du métal due à un transfert d'énergie entre le faisceau incident et l'onde de surface qui se propage sur l'interface métal/diélectrique lorsque les conditions de résonance sont remplies et donc par un pic d'absorption localisé autour de l'angle de résonance dans la plage angulaire de **réflexion totale**. Cette technique permet de détecter tout changement se produisant dans ce milieu diélectrique à moins de 100 nm de l'interface.

Le principe de mesure par SPR est basé sur la courbe de plasmon qui représente la variation de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence. L'optimum de la résonance des plasmons est au voisinage d'un angle d'incidence donnant le minimum de réflectivité.

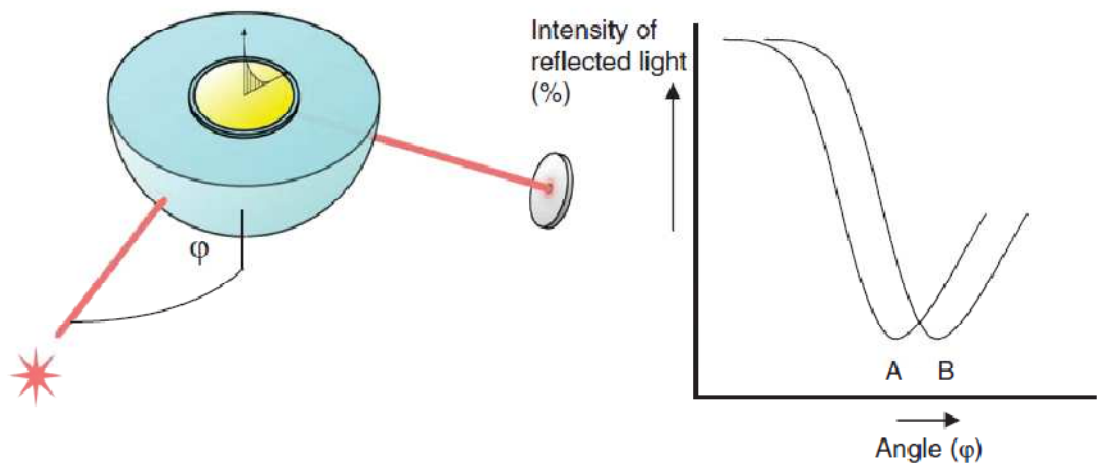


Figure 48 : Schéma du dispositif d'excitation pour la SPR

Une surface d'or recouvre un hémisphère (ou un prisme). La lumière polarisée produite par une source (étoile) est dirigée vers la cellule d'analyse. L'intensité de la lumière réfléchie est mesurée par le détecteur (disque). A un certain angle d'incidence (ϕ), l'excitation des plasmons de surface entraîne une diminution d'intensité de la lumière réfléchie (A). Une modification de l'indice de réfraction à la surface du film d'or est responsable d'une modification de l'angle de A à B.

D'après ^[240].

L'étude des interactions biologiques au niveau de la surface peut donc s'envisager par la mesure soit de la variation de l'angle de résonance, soit de la variation de la réflectivité à un angle fixe. C'est ce dernier mode d'interrogation que nous avons choisi, en sachant que l'angle de mesure choisi doit correspondre au maximum de la pente de la réflectivité pour avoir la meilleure sensibilité possible.

Nous disposons d'une couche mince métallique de quelques dizaines de nanomètres à la surface d'un prisme ; la lumière incidente va pouvoir se coupler avec les électrons de conduction du métal, c'est le plasmon de surface. L'angle pour lequel nous obtenons le maximum de perte d'intensité lumineuse réfléchie est appelé **angle de résonance**. Cet angle dépend des caractéristiques optiques du système et plus précisément des indices de réfraction des milieux présents de chaque côté du métal. Si l'on se place dans ces conditions de résonance (angle de résonance ou angle de réflexion totale), une onde évanescente se forme et va s'atténuer très rapidement en s'éloignant de l'interface (décroissance exponentielle).

Cette onde ne sera sensible qu'aux perturbations au voisinage de l'interface, siège des interactions biomoléculaires et donc insensible à toute perturbation en dehors de cette zone limite. La fixation de biomolécules sur cette interface va perturber la propagation de l'onde évanescente. Avec cette technologie, la molécule immobilisée à la surface du prisme est appelée le ligand, le partenaire perfusé est l'analyte.

La méthode de mesure la plus répandue en imagerie SPR consiste à suivre, pour un angle d'incidence et une longueur d'onde fixés, les variations de la réflectivité. Ces variations sont proportionnelles aux modifications de masses à la surface.

Trois modifications sont possibles :

- ♦ variation de l'indice de réfraction du milieu couvrant,
- ♦ formation d'une couche biologique d'indice de réfraction différent dont l'épaisseur va augmenter au cours du temps,
- ♦ augmentation de la concentration en molécules cibles au voisinage de l'interface se traduisant par une augmentation de l'indice de réfraction dans la couche biologique d'épaisseur constante.

Cette variation est d'autant plus importante que le nombre de molécules sera grand. Ceci permet donc d'une part de quantifier les molécules adsorbées sur la surface et d'autre part de suivre en temps réel les cinétiques des interactions.

II DISPOSITIF

II.1 Système optique

A la différence des appareils disponibles sur le marché, notre dispositif présente un degré d'automatisation très limité et de nombreux réglages sont effectués manuellement.

Trois éléments composent notre système (Genoptics, Orsay, France) :

- ❶ le prisme ; toutes les interactions moléculaires ont lieu à la surface d'un prisme recouvert d'une fine couche d'or (50 nm). Ce prisme possède un fort index de réfraction.
- ❷ la cellule microfluidique dans laquelle ont lieu toutes les mesures. Son volume moyen est de 4 μ l (environ 1 cm de diamètre et 50 μ m d'épaisseur). Elle est positionnée dans une enceinte noire et thermostatée.
- ❸ le système optique composé d'une source monochromatique ($\lambda = 660$ nm). En utilisant une caméra CCD pour la détection du signal, les images peuvent être enregistrées en continu. Les résultats s'expriment en variation de réflectivité en fonction du temps. Chaque courbe obtenue correspond au signal mesuré sur une surface précise du prisme (ces zones d'analyse sont choisies au début de chaque expérience). L'intérêt de ce dispositif est de permettre l'étude de plusieurs zones de la surface en même temps. Il est donc possible de comparer le comportement de différentes cibles quand on injecte la même molécule. L'inconvénient principal pour les mesures d'interactions biomoléculaires est le choix de l'angle optimal (fixe) qui n'est réellement optimal que pour une zone donnée sur la surface (un ou plusieurs spots).

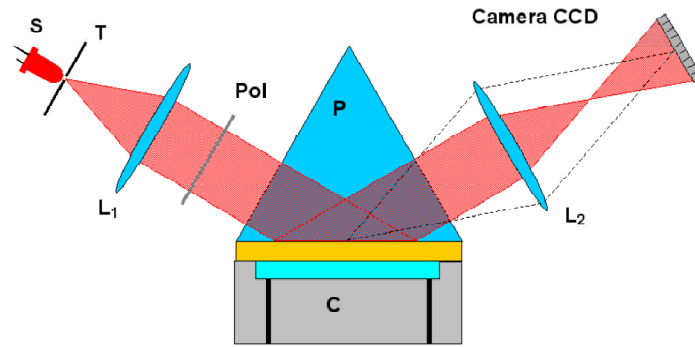


Figure 49 : Biocapteur basé sur l'imagerie SPR

C : cuve, L_1 , L_2 : lentilles, P : prisme dont l'une des faces est recouverte d'or, Pol : polariseur, S : source de lumière monochromatique, T : trou source. D'après ^[241].

Le tampon circule en continu pendant les expériences et les échantillons sont injectés par l'intermédiaire d'une boucle d'injection. Une pompe péristaltique dont le débit est à déterminer fonctionne en continu.

La régulation thermique précise de la cellule d'analyse a fait l'objet de la thèse de JB Fiche ^[241]. Son dispositif permet de travailler sur une gamme de température comprise entre la température ambiante et 80°C et des rampes linéaires de température peuvent être programmées.

II.2 Surface métallique

Il existe différentes méthodes d'immobilisation des molécules d'intérêt. Certaines puces sont commerciales (BIAcore), pour d'autres, les spots peuvent être créés manuellement ou par des spotters automatiques.

Il est essentiel que la méthode choisie ne perturbe pas les interactions potentielles. La capture covalente est très utilisée pour l'immobilisation des acides nucléiques biotinylés ^[242].

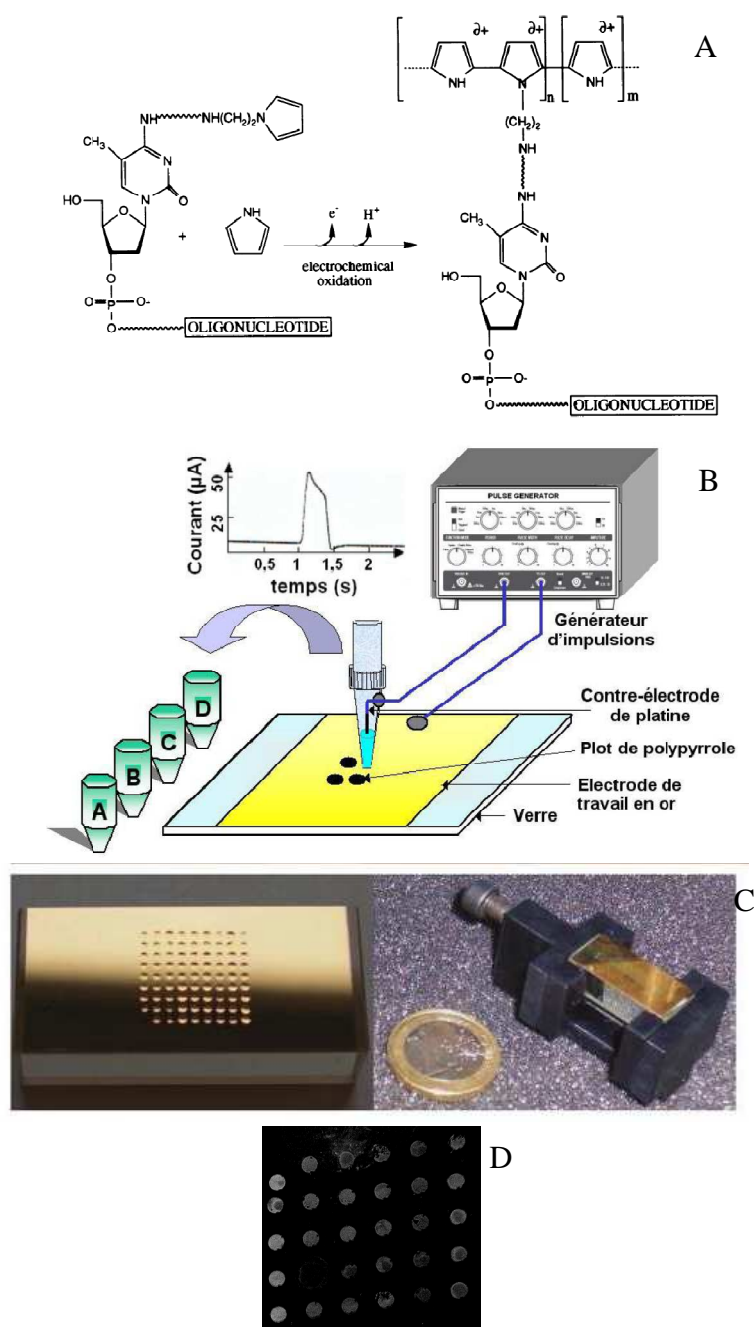


Figure 50 : Surface de la biopuce

A : Copolymérisation électrochimique du pyrrole et d'un oligonucléotide pyrrolé en 5'. Le produit résiduel est un film solide déposé à la surface du prisme ^[243]

B : La synthèse des plots de polymère, décrite par T. Livache et al. ^[243]. Le déplacement de la pipette par rapport à la surface d'or est piloté par trois moteurs permettant un positionnement micrométrique dans les trois dimensions de l'espace et dirigés par le logiciel Polypotter (logiciel développé au CEA Grenoble).

C : Surface d'or du prisme greffé avec environ 80 spots ^[240]

D : Visualisation des spots à la surface du prisme avec notre caméra.

Il existe plusieurs techniques de préparation des puces à ADN. Celle développée par l'équipe du laboratoire (T. Livache) utilise l'électropolymérisation du pyrrole ^[244] ; un mélange de pyrrole simple et de pyrrole modifié par la sonde est à l'intérieur d'un cône de pipette, sur la surface d'or. Une différence de potentiel est ensuite appliquée (2V) entre l'or et le fil de platine plongé dans le cône. Ceci entraîne la polymérisation du pyrrole sous forme d'une fine couche de quelques nanomètres d'épaisseur et d'environ 300 μm de diamètre. Aujourd'hui, le laboratoire CREAB est capable de greffer un groupe pyrrole sur, entre autres, des oligonucléotides, des protéines ^[245] et des oligosaccharides ^[246].

Le choix du pyrrole est justifié par ses nombreuses propriétés chimiques et physiques avantageuses : hydrosoluble, facilement oxydable, polymérisation à pH neutre avec un potentiel relativement faible. De plus, les spots peuvent être réalisés en une seule étape sans aucun traitement chimique préalable de la surface.

Dans tous les cas, l'étape préliminaire avant l'analyse en SPRI est le contrôle de la qualité des spots (avec leur image). Grâce à l'imagerie, nous pouvons détecter des hétérogénéités de surface, des défauts sur la surface d'or, des erreurs de greffage et des bulles d'air éventuelles. Ceci est très utile pour la sélection des aires de mesure. L'or est choisi comme une surface de contrôle.

Si nous envisageons l'utilisation de spots comportant des oligonucléotides, le prisme peut être utilisé plusieurs fois. A la fin de chaque expérience, l'injection d'une solution de soude permet de retrouver la configuration initiale avec les oligonucléotides monobrins de départ.

II.3 Sensorgramme

L'analyse consiste à suivre les variations de réflectivité en fonction du temps. Une cinétique d'interaction se divise en trois parties. Tout d'abord, le prisme est mis en contact avec la solution tampon sans les cibles afin de mesurer la réflectivité initiale qui va servir de référence. Ensuite, les molécules cibles, diluées dans la même solution tampon, sont injectées et vont interagir avec les sondes, c'est l'association. Une masse égale de deux protéines différentes liées à la surface donnera la même intensité de réponse. Enfin, le tampon seul est de nouveau injecté, c'est la phase de rinçage ou dissociation. Cette dernière phase nous permet de mesurer la réflectivité finale dans les mêmes conditions que la réflectivité initiale. La différence de réflectivité correspond alors au changement d'indice provoqué par la fixation stable de la cible sur les sondes.

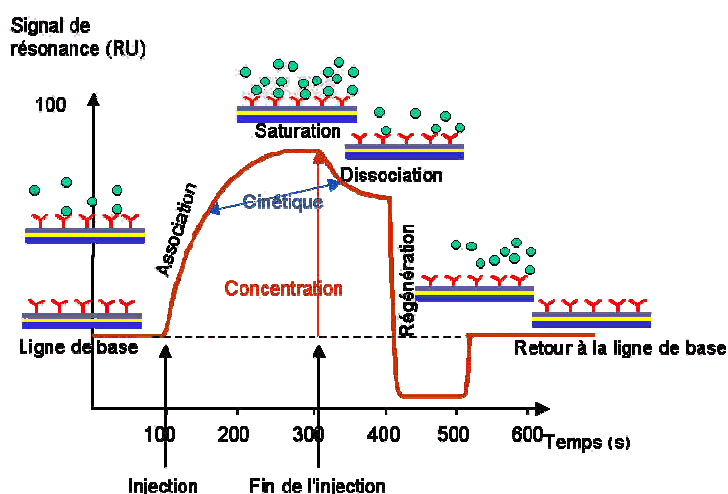


Figure 51 : Sensorgramme montrant les différentes étapes d'un cycle analytique D'après ^[240].

II.4 Avantages de cette technique

❶ Absence de marquage

La préparation des échantillons est ainsi plus aisée. De plus, la fonctionnalité des molécules d'intérêt n'est pas influencée par ce type d'artifice.

❷ Analyse en temps réel

Ceci permet d'obtenir des informations sur les cinétiques d'interactions, à la différence du gel retard. A noter toutefois que la protéine ne peut se fixer que d'un côté de l'ADN car une extrémité est liée à la surface de la puce.

❸ Détection en parallèle

La comparaison des résultats obtenus est facilement réalisable (mesures en même temps, dans les mêmes conditions de tampon et de température)^[177].

❹ Sensibilité

La SPRI permet de détecter des variations de masse au niveau de l'interface et différentes méthodes ont été décrites pour augmenter cette sensibilité^[233].

❺ Analyse non destructrice

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les protéines retenues à la surface peuvent être ensuite analysées par spectrométrie de masse, soit directement à la surface de la chip, soit après une élution^[224]. Cette analyse peut révéler des variants protéiques dus à des modifications post-traductionnelles et des complexes qui ne sont pas détectables par la SPR seule^[231].

III CONTEXTE DE SON UTILISATION

La SPRI est un outil de choix pour l'étude d'interactions ADN/protéine car elle rend possible l'observation de phénomènes rapides et surtout la comparaison d'interactions avec différentes séquences d'ADN greffées sur la surface. La première publication rapportant une étude d'interaction de ce type par SPR date de 1993.

Tableau VII : Exemples d'études de DNA binding proteins par SPR

Protéine analysée	Année	Auteur
Repressor lactose	1993	Bondeson ^[212]
Récepteur nucléaire SF-1	1999	Bryan ^[247]
High mobility group proteins (HMG)	2000	Webster ^[248]
Hélicases bactériennes	2001	Pacek ^[249]
Topoisomérase	2002	Renodon-Cornière ^[250]
Polymérases	2003	Gruz ^[251]
Telomérases	2003	Maesawa ^[252]
Inhibiteur de l'activateur du plasminogène	2003	Grinberg ^[253]
Topoisomérase	2003	Leontiou ^[254]
Facteur transcription ADR1	2003	Schaufler ^[255]
Facteur de transcription NtERF2*	2003	Hao ^[256]
Réplication protéine A (RPA)	2003	Schubert ^[179]
Protéine P53	2004	Maillart ^[214]
Polymérases	2004	Tsoi ^[257]
Récepteur estrogènes	2007	Teh ^[258]
Facteur de transcription LFY**	2009	Moyroud ^[259]

* : protéine fixée sur la puce et injection d'oligonucléotides.

** : première analyse sur un gène entier immobilisé (plus de 3000 paires de bases)

Des interactions ADN/petites molécules ont également été visualisées par SPR ; c'est l'exemple de la Netropsin, un antiviral dont la masse moléculaire est de 432 Da et qui se lie aux paires de bases A-T^[260].

Plus spécifiquement certaines glycosylases (rapportées dans le tableau ci-dessous) ont déjà fait l'objet d'étude par SPR :

Tableau VIII : Exemples d'études d'ADN glycosylases par SPR

Protéine analysée	Année	Auteur
Enzymes bactériennes		
UDG	1998	Panayotou ^[261]
MutS	1999	Johnson ^[262]
UDG	1999	Purnapatre ^[263]
MutS	2003	Fourrier ^[264]
Enzymes humaines		
Ape1	2001	Privezentzev ^[265]
Protéine S3 ribosomale*	2004	Hegde ^[266]
Alkyl-N-purine-ADN glycosylase	2004	Gros ^[267]
N-methylpurine-ADN glycosylase	2009	Adhikari ^[268]

**activité glycosylase discutée pour cette enzyme favorisant l'action d'autres glycosylases*

Dans notre cas, la SPRI n'est pas utilisée pour calculer des constantes cinétiques des protéines enzymatiques comme les glycosylases. Notre étude s'est focalisée sur les interactions parallélisées de différentes lésions de l'ADN face à des protéines purifiées. Le projet à long terme est de rechercher des protéines se liant à des lésions de l'ADN à partir d'extraits cellulaires de Procaryotes ou d'Eucaryotes.

IV DESCRIPTION DE NOTRE DISPOSITIF

Ce travail s'est déroulé entre 2005 et 2009. Il a été mené en collaboration avec le Dr Didier Gasparutto (Laboratoire de lésions des acides nucléiques LAN) et le Dr Thierry Livache (Laboratoire de la Chimie de la Reconnaissance et Etude des Assemblages Biologiques CREAB) au CEA de Grenoble. Les résultats obtenus sont déjà intégrés dans deux doctorats de Physique : JB Fiche, thèse soutenue le 15 novembre 2006 ^[241] et J Fuchs, thèse soutenue le 5 novembre 2009 ^[269].

Notre dispositif nous a permis d'observer dans un premier temps les hybridations ADN/ADN et dans un deuxième temps la liaison des protéines au double brin d'ADN néoformé *in situ* et la conséquence éventuelle de cette liaison.

IV.1 Les zips et leur hybridation (construction du ligand)

Nous avons une double exigence : travailler sur de l'ADN double brin et pouvoir utiliser notre puce plusieurs fois. Il était donc impossible de greffer directement sur la surface d'or les oligonucléotides d'intérêt car chaque injection de protéine a la capacité de modifier les bases étudiées.

Le greffage de zips nous a permis de répondre à nos pré requis. Ces zips permettent en effet l'adressage des différentes séquences sur la puce. Ces zips sont des séquences monobrins de 24 bases qui se divisent en 6 tétramères. Ces séquences ne s'apparient à aucune autre séquence zip complémentaire ^[270].

1^{ère} étape

Greffage des zips (24 bases) sur la surface d'or par la technique d'électro-polymérisation décrite sur la figure 50. Le nombre de zips est déterminé par le nombre de séquences à analyser. Plusieurs séquences zips étaient disponibles dans notre laboratoire, avec une homologie composée de 10 bases T et une terminaison pyrrole en 5'. Les bases T servent de bras espaceur pour limiter l'influence de la surface.

Dans notre étude, nous avons choisi les zips 2, 6, 7 et 9 (cf tableau IX). En général 4 à 5 spots de chaque zip sont réalisés de manière à analyser une réaction moyenne.

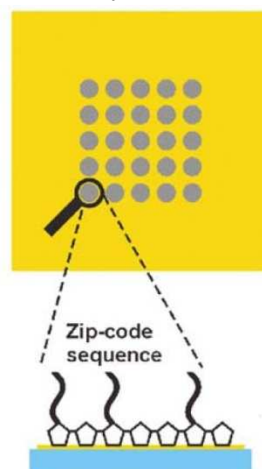


Figure 52 : Greffage des zips

Chaque spot sur la surface d'or correspond à la présence d'un oligonucléotide simple brin, dont la nature et la concentration sont choisies. D'après ^[214].

La densité de greffage a été testée lors des premières expériences (de 1,25 à 10 μM) et la concentration de 10 μM nous a permis d'obtenir un signal optimal d'environ 2% de réponse.

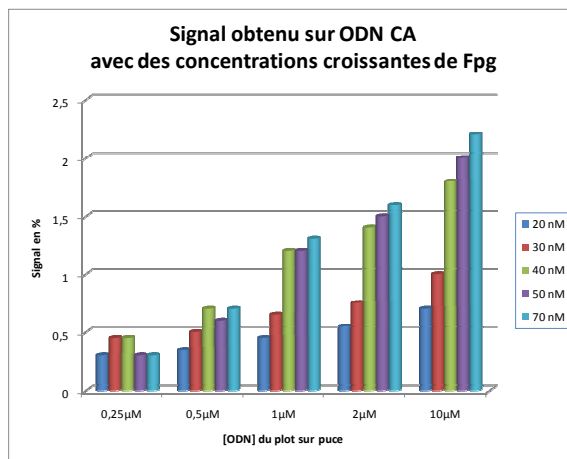


Figure 53 : Test de la densité de greffage des plots
avec différentes concentrations de Fpg vis-à-vis d'un oligonucléotide comportant la lésion cycloadénine (reconnaissance sans coupure). En abscisses, la concentration du zip utilisé pour le greffage. En ordonnées, la modification de réflectivité obtenue avec différentes concentrations de Fpg (de 20 à 70 nM). La concentration en zip de 20 μM n'a pas été testée puisque le signal mesuré durant l'hybridation est équivalent à celui obtenu pour 10 μM .

2^e étape

Hybridation, dans un tube à l'extérieur du système, du zip complémentaire (46 bases) avec l'oligonucléotide d'intérêt (22 bases). Le zip complémentaire est un oligonucléotide simple brin composé de 2 parties :

- ♦ une séquence en 3' parfaitement complémentaire du zip greffé sur la puce
- ♦ une séquence en 5' commune à tous les zips complémentaires et s'hybridant avec l'oligonucléotide étudié.

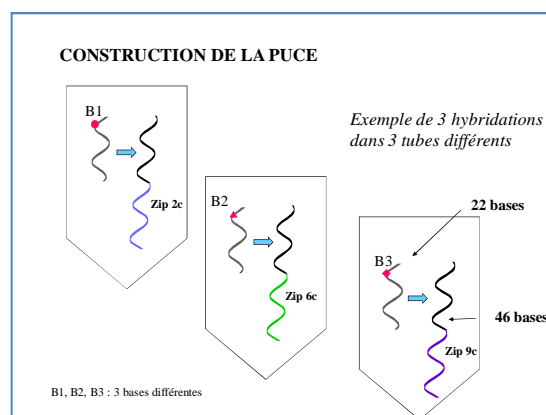
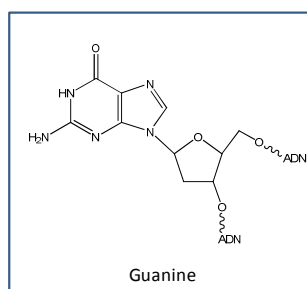


Figure 54 : Schéma rappelant l'hybridation des zips complémentaires
avec l'oligonucléotide étudié, avant l'injection sur la puce comportant plusieurs zips.

Ces oligonucléotides ont été synthétisés en utilisant la chimie des synthons phosphoramidites sur support (Applied Biosystems), déprotégés en milieu ammoniacal et purifiés par HPLC.

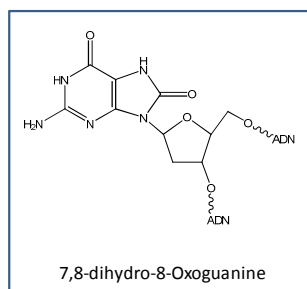
Pour pouvoir comparer des interactions protéine/ADN en fonction de la nature des lésions, les séquences doivent être identiques, à l'exception des bases endommagées. Il est également essentiel d'obtenir une hybridation totale du zip complémentaire donc la quantité d'oligonucléotide d'intérêt est en excès de 10 %. Le mélange est chauffé 3 min à 90°C puis ramené lentement à température ambiante.

L'oligonucléotide de 22 bases choisi pour l'étude comporte une base G en position 8 de l'extrémité 5', c'est cette base qui est substituée par différentes lésions pour obtenir l'ensemble de notre panel d'oligonucléotides.



a) Substitution possible par une base oxydée

C'est la base 8-oxoG que nous avons utilisée, substrat des enzymes Fpg et OGG1^[5]. Cette lésion a été choisie dans notre étude car elle est très mutagène (hybridation possible avec l'adénine durant la réplication). Il s'agit d'une lésion prévalente dans des conditions de stress oxydant^[40]. Comme nous l'avons vu précédemment, les deux enzymes Fpg et OGG1 sont capables d'initier la voie de réparation par excision de bases (BER) avec la base 8-oxoG, respectivement chez les Procaryotes et chez les Eucaryotes.

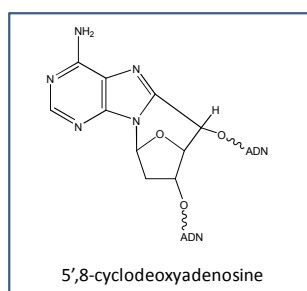


b) Substitution possible par une base cyclisée

La cycloadénine (CA) est une lésion rarement retrouvée en clinique mais décrite comme piège vis-à-vis des protéines de réparation ; ce n'est pas un substrat pour la Fpg^[271].

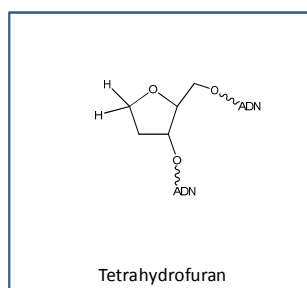
Elle résulte de l'action du radical hydroxyle sur l'ADN. Cette lésion bloque les polymérases de l'ADN. L'isomère S est plus toxique que le R^[271] ; c'est une lésion endogène qui pourrait contribuer à la neurodégénération dans le Xeroderma pigmentosum^[85]. En effet, l'accumulation de cyclopurines interfère avec la transcription, soit en complexant, soit en altérant certains facteurs de transcription.

La synthèse chimique d'oligonucléotides cyclisés a fait l'objet d'une publication en 1999 par le laboratoire des lésions des acides nucléiques au CEA^[272].

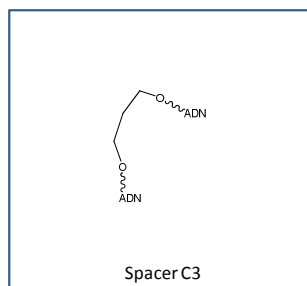


c) Substitution possible par un analogue de site abasique

➤ THF ou tétrahydrofurane, un analogue stable de lésion obtenu par synthèse et qui mime le comportement d'un site abasique (connu comme instable)



➤ C3, composé de 3 atomes de carbone remplaçant un désoxyribose, mimant également un site abasique.

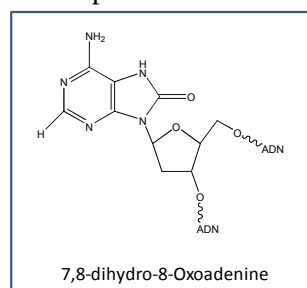


THF et C3 remplacent artificiellement les sites abasiques « vrais » observés *in vivo*, insuffisamment stables pour des études biochimiques *in vitro*. Ces 2 dernières lésions sont

décrites comme des substrats pour la Fpg car l'intermédiaire réactionnel de son activité lyase est un site abasique ^[15].

d) Lésions tandem

Nous avons également utilisé des lésions tandem : une lésion 8-oxoA est ajoutée côté 3' au brin comportant une base 8-oxoG ou THF. Les 2 lésions sont soit vicinales (position 1), soit séparées de 6 bases (position 7), comme précisé dans le tableau IX. De telles lésions tandem existent *in vivo* et l'intérêt de l'étude de leur réparation est à souligner ^[96].



3^e étape

Injection de chaque tube obtenu à l'étape 2 (concentration de 250 nM) et visualisation de la réaction en SPRI. Il était envisageable d'injecter le mélange des zips complémentaires hybridés mais dans un souci de rigueur, nous avons choisi des injections consécutives. Elles nous ont permis de contrôler, lors de chaque expérience, la spécificité de la réaction et l'absence de réactions croisées entre zips. Cette 3^e étape se déroule à 45°C afin de minimiser ce type de réactions indésirables et surtout de limiter la formation de structures secondaires. L'ordre d'injection des séquences respecte l'ordre de stabilité des oligonucléotides (par exemple, les sites abasiques sont toujours injectés en dernier). Nous obtenons ainsi des signaux très homogènes, quelle que soit la séquence.

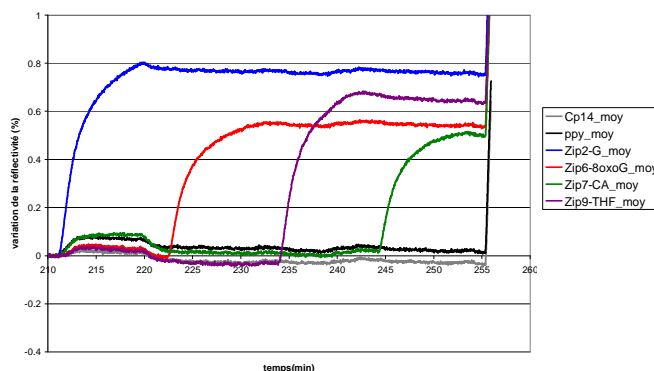


Figure 55 : Sensorgramme montrant les différentes étapes d'hybridation des zips complémentaires à 250 nM.

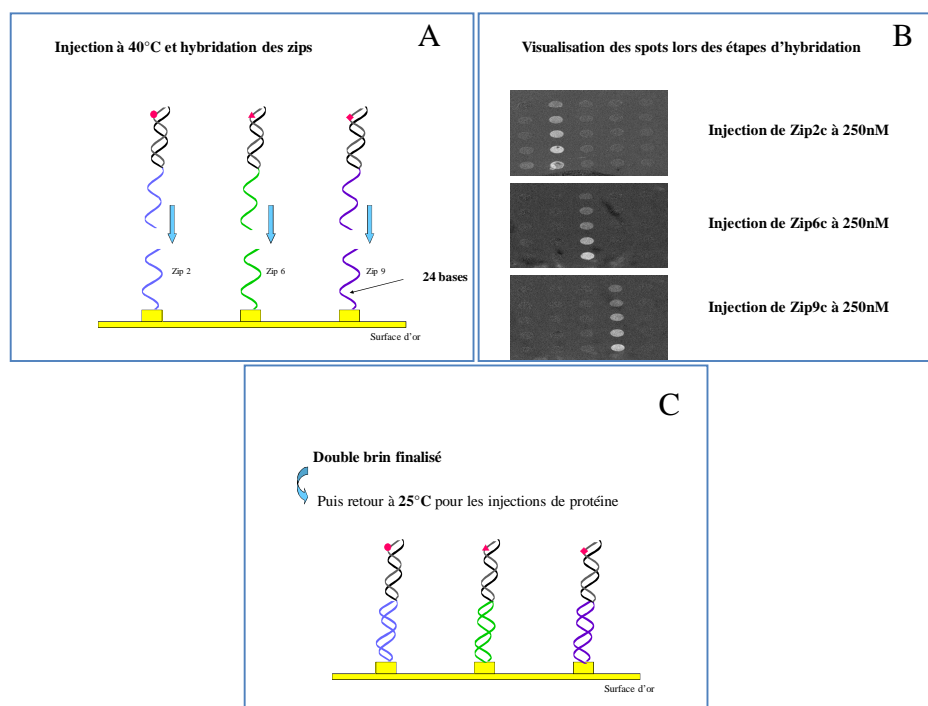


Figure 56 : Construction de la puce en 3 étapes

A, injection des doubles-brins partiels réalisés à l'étape précédente sur la puce et contrôle de la spécificité sur l'image (B), C, doubles brins prêts pour l'injection des protéines étudiées.

4^e étape (post-analytique)

Une injection de soude 0,3M à la fin de chaque expérience permet de retrouver la configuration initiale de la puce, ne comportant que les zips à sa surface. Il est important d'effectuer un rinçage minutieux de l'ensemble du système avant d'initier une nouvelle hybridation ^[260].

Tableau IX : Séquences étudiées en SPRI

Name	Sequence 5'→3'
Poly-pyrrole probes	
Zip2	pyrrole-T ₁₀ -CAG CAC CTG ACC ATC GAT CGC AGC
Zip6	pyrrole-T ₁₀ -GAC CGG TAT GCG ACC TGG TAT GCG
Zip7	pyrrole-T ₁₀ -TGC GAT CGC AGC GGT AAC CTG ACC
Zip9	pyrrole-T ₁₀ -GAC CAT CGT GCG GGT AGG TAG ACC
CP14	pyrrole-T ₁₀ -GCC TTG ACG ATA CA
A24	pyrrole-T ₁₀ -CAA GTG TGA CCC AGT AAG TGA GGG
Zip complementary targets 3'→5' (part complementary to studied sequence in bold)	
Zip2c	GTC GTG GAC TGG TAG CTA GCG TCG GTG AAG CCT AGC ACT GAC TAG A
Zip6c	CTG GCC ATA CGC TGG ACC ATA CGC GTG AAG CCT AGC ACT GAC TAG A
Zip7c	ACG CTA GCG TCG CCA TTG GAC TGG GTG AAG CCT AGC ACT GAC TAG A
Zip9c	CTG GTA GCA CGC CCA TCC ATC TGG GTG AAG CCT AGC ACT GAC TAG A
CP14c	TCT CAC GGA ACT GCT ATG TCG ATT AAG TCT TAG TAA AAC A
Studied sequence with/without lesion 5'→3'	
ODN-G	CAC TTC GGA TCG TGA CTG ATC T
ODN-G-bio	CAC TTC GGA TCG TGA CTG ATC T -biotin
ODN-8oxoG	CAC TTC G8-oxoGA TCG TGA CTG ATC T
ODN-8oxoG-bio	CAC TTC G8-oxoGA TCG TGA CTG ATC T -biotin
ODN-Cyelo-A	CAC TTC GCAA TCG TGA CTG ATC T
ODN-THF	CAC TTC GTHFA TCG TGA CTG ATC T
ODN-C3	CAC TTC GC3A TCG TGA CTG ATC T
Sequence with tandem lesions 5'→3'	
ODN-8G/8A-1st	CAC TTC G8-oxoG 8-oxoA TCG TGA CTG ATC T
ODN-8G/8A-7th	CAC TTC G8-oxoGA TCG TG 8-oxoA CTG ATC T
ODN-THF/8A-1st	CAC TTC GTHF 8-oxoA TCG TGA CTG ATC T
ODN-THF/8A-7th	CAC TTC GTHFA TCG TG8-oxoA CTG ATC T

CP14 et A24 sont des séquences contrôles simple-brins ; elles peuvent être utilisées comme référence pour déduire le signal non spécifique obtenu lors d'une injection de protéine. Les oligonucléotides biotinylés sont synthétisés par la société Eurogentec. Les autres séquences ont été préparées par le Dr Gasparutto (CEA Grenoble) : synthèse sur support selon la chimie phosphoramidite suivie d'une purification sur gel de polyacrylamide et par HPLC (Merck L6200)

IV.2 Le tampon

Comme les interactions ADN/protéine sont de nature ionique, le choix de la composition du tampon est primordial. Les protocoles expérimentaux de la littérature sont nombreux. Si nous nous focalisons sur les études impliquant des protéines de liaison à l'ADN, nous constatons que la plupart des tampons utilisés contiennent de l'Hepes et des concentrations comprises entre 50 mM et 200 mM de sel, NaCl ou KCl ^{[214] [261] [257] [266] [263] [17]}. Ils contiennent également de l'EDTA et/ou des sels de Mg.

La composition de notre tampon est originale et résulte de plusieurs sources différentes : une publication portant sur l'étude des protéines de liaison à l'ADN ^[165], les tampons utilisés pour les gels retard et différents essais réalisés au préalable pour des captures de protéines sur oligonucléotides couplés à des billes magnétiques.

Sa composition est la suivante :

- . Tris HCl 30 mM,
- . MgCl₂ 3mM,
- . KCl 100 mM,
- . EDTA 1,3 mM,
- . DTT 0,2 mM, ce dernier composant étant ajouté extemporanément.

Une étude a montré que la force ionique du milieu ainsi que la concentration en ions divalents avaient une importance significative sur l'action des glycosylases ; une augmentation de la force ionique et de la concentration en ions magnésium favoriseraient les interactions spécifiques ^[273]. Si l'on regarde plus spécifiquement les conditions nécessaires à l'analyse des activités glycosylases de Fpg et OGG1, nous savons que les cations divalents ne sont pas nécessaires pour les deux activités glycosylase et lyase ; la formation du complexe est donc insensible à la présence d'EDTA ^[64]. De plus, le pH optimal pour les deux activités est compris entre 7 et 7,8. La présence de KCl ou NaCl à 100 mM stimule leur activité ^[45].

Notre tampon est utilisé du début à la fin d'une expérience SPRI, permettant l'hybridation initiale des oligonucléotides, l'injection des protéines d'intérêt, le rinçage... Il circule avec un débit de 5 ml/h.

Sa filtration (0,22 µm) avant chaque utilisation est une précaution utile à la minimisation du bruit de fond. Le rôle du tampon n'est pas seulement important pour les étapes de liaison des protéines mais aussi pour les étapes de lavage. En effet, plusieurs approches ont été décrites pour minimiser les interactions non spécifiques : immobilisation homogène des ligands, modifications des propriétés de la surface, mais les caractéristiques du lavage peuvent à elles seules moduler la liaison des protéines non spécifiques ^[189].

Il est toutefois important de préciser que le choix de ce tampon a été influencé par des résultats obtenus avec la protéine Fpg. Il est donc possible qu'il ne représente pas le tampon optimal pour l'ensemble des protéines étudiées.

IV.3 Le blocage de la surface

Notre objectif était de limiter les interactions non spécifiques des protéines étudiées avec la surface. En effet, dès les premières injections de Fpg, nous avons observé une variation de réflectivité sur la surface d'or, suffisante pour empêcher l'observation d'un signal spécifique. L'utilisation de serum albumine bovine n'a pas corrigé cet artefact, probablement à cause de son pI de 4,8 très différent de celui de la Fpg (pI = 9,6). Mais des injections de Cytochrome C à 1µM (pI = 10,7) nous ont permis, au début de chaque expérience, de bloquer durablement la surface de la puce. Nous avons montré que l'injection de Cytochrome C provoque un signal non négligeable sur l'or et qu'elle ne modifie pas l'hybridation. Trois injections de Cytochrome C à 1µM sont réalisées au début de chaque expérience pour garantir l'absence d'interactions non spécifiques.

Malgré l'efficacité du blocage, nous avons observé une instabilité des protéines au cours de leur injection. Notre hypothèse explicative s'est portée sur une interaction potentielle des protéines injectées avec la boucle en Teflon, phénomène déjà observé entre le Teflon et les immunoglobulines G ^[274] ; nous avons donc utilisé une boucle en PEEK dont le diamètre interne est le même que celui de la boucle d'injection d'origine. Ce problème a été ainsi corrigé.

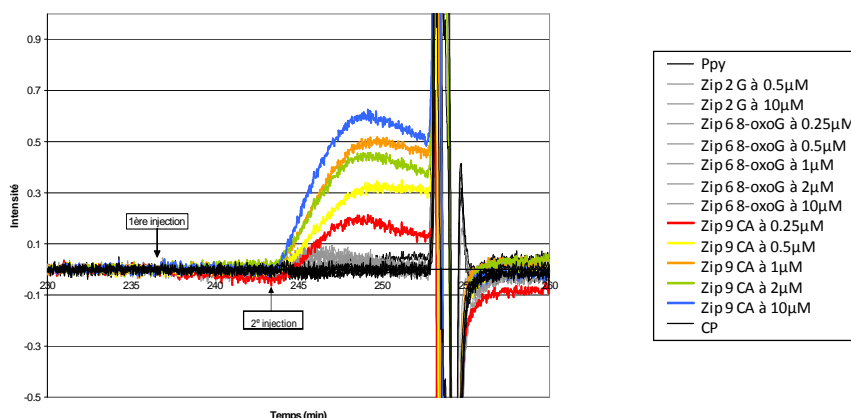


Figure 57 : Influence du matériau utilisé pour la fluidique

Deux injections de la protéine Fpg à 50 nM et étude du signal sur les plots zip9 hybridés avec les oligonucléotides comportant la cycloadénine. Les courbes en couleur correspondent à ces oligonucléotides, (les autres étant grisées). Les concentrations d'ADN sont croissantes (du rouge au bleu). Nous verrons ultérieurement qu'il est normal d'obtenir un signal sur la lésion CA et non sur 8-oxoG.

1^{ère} injection après stagnation de la protéine 30 min dans la boucle en Teflon et 2^e injection après stagnation dans un tube eppendorf (le signal est identique après stagnation dans un boucle d'injection en PEEK). Notre test montre que la Fpg est intégralement détruite ou adsorbée dans la boucle en Teflon en 30 min.

Nous nous sommes également interrogés sur la nature des tubes Eppendorf utilisés pour réaliser la dilution de la protéine avant injection et nous avons testé 3 références de tubes en polypropylène, siliconés ou non. Les sensorgrammes obtenus dans des conditions expérimentales exagérées (temps d'attente avant injection de 2h) montrent des différences importantes. Il existe donc une interaction non spécifique de la protéine Fpg avec certains tubes ; adsorption sur les parois ?, dénaturation de la protéine ? Bien que le temps d'attente réel soit d'une dizaine de minutes maximum (dilution préparée extemporanément), il a été décidé d'utiliser toujours la même référence de tubes.

V ETUDE DES ENZYMES DE REPARATION

V.1 Les protéines analysées

Tableau X : Liste des enzymes utilisées au cours de notre étude

Enzyme	Fournisseur	Concentration	MM en kDa
Fpg	RetD Systems	1,12 g/l	30
	S. Boiteux	2,6 g/l	
	Sigma	0,23 g/l	
	B. Castaing	7,6 g/l	
Fpg E2Q*	S. Boiteux	8 g/l	
Endo IV	RetD Systems	1 g/l	31
OGG1	Trevigen	100 U/50 μ l	38
Ape1	Trevigen	1000 U/400 μ l	37

*Fpg mutée issue de *Bacillus stearotherophilus*.

Pour chaque enzyme, nous avons déterminé la concentration optimale de l'aliquot à injecter en SPRI, compromis entre d'une part la limite de sensibilité de la technique et d'autre part la possibilité de réactions non spécifiques et le coût de ces protéines.

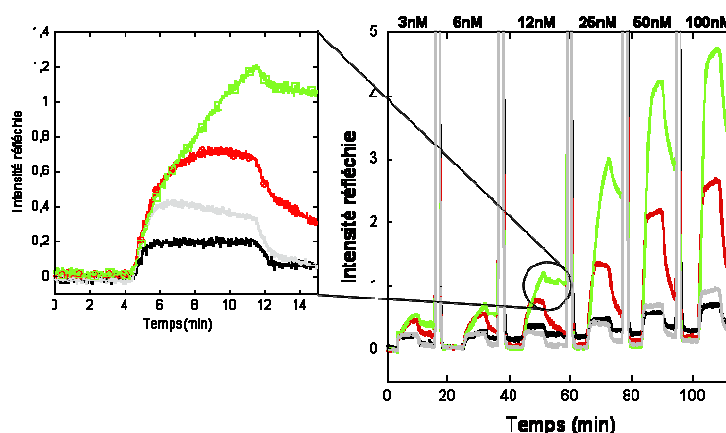


Figure 58 : Injections de la protéine Fpg à des concentrations croissantes

de 3 à 100 nM. Noir polypyrrole, Gris ADN simple brin, Rouge ADN double brin sans lésion, Vert ADN double brin comportant une base CA. Entre chaque injection, la puce est régénérée par une solution de NaCl 1,5M.

Dans cet exemple, la limite de sensibilité est de 3nM, la distinction entre les séquences d'ADN lésé ou non ne devient réellement manifeste qu'à partir de 12nM.

De même la recherche de la température optimale a nécessité plusieurs expériences : 25°C pour les protéines bactériennes et 37°C pour les protéines humaines. A 20°C, nous ne visualisons pas de signal pendant la durée de l'injection.

Toutes ces protéines sont conservées à -20°C. Il est à noter que les tampons de conservation contiennent du glycérol (30 à 50%) pour permettre la congélation de la protéine ; sa présence sera détectée en SPRI. Avec les enzymes commerciales, nous avons été gênés par la présence de BSA qui provoque un bruit de fond très important en SPRI. A titre d'exemple la Fpg

commercialisée par le laboratoire SIGMA n'était pas assez pure pour être utilisée et aucun résultat obtenu avec cette enzyme n'a pu être exploité. Nous avons donc sélectionné les fournisseurs en conséquence. La SPRI pourrait même être un excellent outil pour qualifier un lot d'enzyme comme la Fpg et déterminer la présence éventuelle de protéines contaminantes responsables de signaux non spécifiques sur l'ADN ou de molécules générant un bruit de fond gênant. Un nouvel outil de contrôle qualité ?

Nous avons également injecté des extraits cellulaires d'*E. coli*, à 0,5 g de protéines/l. Ils ont été filtrés pour éviter toute injection de particules ou d'agrégats qui pourraient nuire à la qualité des données recueillies. Nous aborderons les résultats ultérieurement.

V.2 La régénération

Cette étape a lieu après l'injection de protéines. Cette opération consiste en une injection brève de solution fortement éluvative permettant de dissocier rapidement et de manière exhaustive toutes les molécules d'analyte restant associées au ligand après la fin de la phase de dissociation. Un soin tout particulier doit être apporté à la recherche des conditions optimales de régénération ; une régénération insuffisante entraîne, au cours des cycles successifs une accumulation progressive de molécules d'analyte sur le ligand, saturant celui-ci et faussant les mesures ultérieures, à l'opposé une régénération trop drastique peut entraîner une perte de ligand.

Trois possibilités sont retrouvées dans les protocoles de la littérature :

- ♦ soit un détergent ionique
SDS de 0,05% à 0,5% ^[261] ^[262]
- ♦ soit une modification de la force ionique du milieu
NaCl de 1M à 2M ^[275] ^[251].
- ♦ soit une combinaison des deux
NaCl 0,5M et SDS 0,005% ^[209].

Nous avons choisi l'injection de NaCl à 1,5M afin de ne pas risquer la création de bulles avec le SDS. Cette force ionique provoque la dissociation des protéines liées à l'ADN et présente également l'avantage de stabiliser le duplex d'ADN ^[269]. Il est toutefois important de rincer la boucle d'injection avec du tampon après chaque injection de sel car les résultats peuvent être perturbés par des traces de sel.

Lors de cette élution, nous observons généralement une très forte baisse du signal et nous avons tenté, au cours des premières expériences, d'identifier la nature de l'éluat en réalisant une électrophorèse suivie d'une coloration argentique mais la forte salinité de l'échantillon et la faible quantité de protéine récoltée en sortie du dispositif (estimée de l'ordre de la femtomole) ne nous a pas permis d'obtenir de résultat d'identification.

V.3 Analyse de la liaison ADN/enzyme

Il nous était impossible de calculer des constantes cinétiques d'association ou de dissociation pour quatre raisons :

- Les signaux obtenus sur les sensorgrammes montrent rarement un état d'équilibre (instabilité de la liaison de la protéine à l'ADN ?)

➤ Le signal mesuré résulte de la superposition d'un signal spécifique et d'un signal non spécifique (reconnaissance de l'ADN double brin).

➤ Les interactions observées peuvent être modulées par le débit de la fluïdique. A faible débit, l'enzyme a la capacité d'entrer en contact avec plusieurs brins d'ADN. A haut débit, l'enzyme est éliminée plus rapidement de la cellule de mesure.

Nous mesurons avec notre dispositif la variation globale de l'index de réfraction de chaque spot.

➤ De plus, il est très difficile d'obtenir une reproductibilité parfaite de deux injections d'enzyme (faibles volumes pipetés dans une solution visqueuse comportant du glycérol). Nos résultats sont donc issus d'une analyse qualitative.

Néanmoins, le fait de mettre en solution des doubles brins d'ADN (avec ou sans lésion) réduirait la réassociation de la protéine avec les oligonucléotides de la puce. Cet effet « parking » pourrait probablement être éliminé en augmentant le débit du tampon. Cette approche mériterait d'être approfondie si nous souhaitions calculer des constantes cinétiques pour les différentes interactions étudiées.

Nous avons réalisé des tests de compétition en injectant, après la protéine, des oligonucléotides doubles-brins comportant une base normale ou une base mutée. L'idée initiale était de diminuer l'interaction non spécifique de la protéine Fpg avec l'ADN double brin immobilisé. Cette approche a déjà été réalisée par l'équipe d'Adhikari ^[276] en utilisant un anticorps monoclonal vis-à-vis de l'enzyme N-méthylpurine glycosylase.

Nous avons observé des différences de cinétique de dissociation, avec un phénomène plus rapide en présence de duplex en solution. Le processus de dissociation observé dans nos conditions expérimentales n'est probablement que partiel (une partie des protéines pourraient se lier successivement à plusieurs doubles-brins), vu la lente diminution du signal en l'absence de duplex.

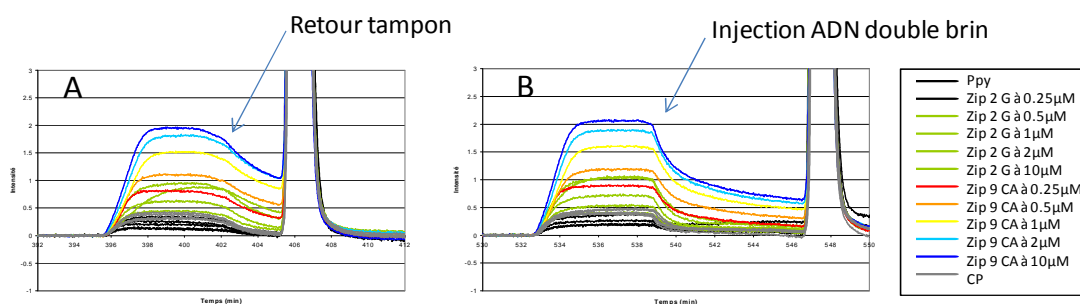


Figure 59 : Tests de compétition

Injections de la protéine Fpg à 50 nM sur un oligonucléotide sain et un oligonucléotide comportant la base CA, suivie d'un passage en tampon (A) ou d'une injection d'un oligonucléotide double brin à 100 nM (B).

L'expérience a été répétée avec un ODN double brin comportant THF, CA ou 8-oxoG (résultats non montrés).

V.4 Révélation de l'activité enzymatique

Il est très difficile de détecter et d'analyser un signal spécifique lors de l'injection de la protéine ou de son élution. Comme l'activité enzymatique ne peut être étudiée directement, nous avons testé trois approches différentes :

V.4.1 Première approche : deux injections consécutives d'enzyme

Pendant la 1^{ère} injection, nous observons trois comportements différents : une forte interaction spécifique avec les séquences comportant les lésions, une interaction plus faible avec l'ADN double brin non lésé et une interaction non spécifique avec les plots de polypyrrole et l'ADN simple brin. Cette répartition des courbes est conforme aux résultats de la littérature ^[9]. Lors de la deuxième injection de Fpg, nous obtenons un sensorgramme très différent pour les plots contenant la base 8-oxoG (*courbe rouge*). Ceci signifie que l'action enzymatique lors de la première injection a modifié la structure de l'oligonucléotide qui n'est plus substrat lors de la 2^e injection. (A l'inverse, le résultat obtenu sur les plots comportant la lésion CA, *courbe verte*, montre que la Fpg reconnaît cette lésion de manière spécifique et reproductible, sans action enzymatique, observation en accord avec d'autres travaux ^[271]).

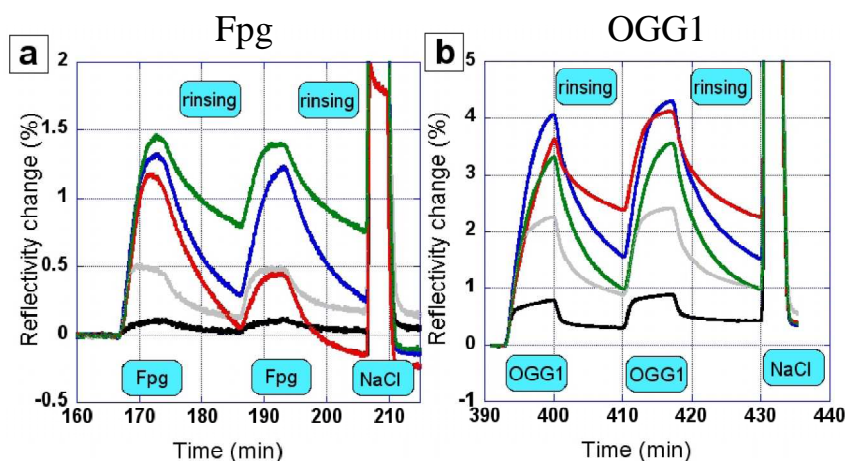


Figure 60 : Deux injections consécutives d'enzyme

a) Injection de la protéine Fpg à 50 nM suivie d'un passage en tampon et d'une 2^e injection de Fpg à la même concentration puis injection de NaCl 1,5M. b) même protocole avec la protéine OGG1 à 50 nM.

Noir : polypyrrole, Gris : ADN simple brin, Bleu : ADN double brin, Rouge : ADN comportant une base 8-oxoG, Vert : ADN comportant une base CA.

En revanche, le sensorgramme est très différent avec une double injection d'OGG1 qui a les capacités de se lier une 2^e fois à l'ADN comportant initialement la base 8-oxoG (*courbe rouge*). On peut supposer que :

➤ l'action de cette enzyme dans notre dispositif est beaucoup plus lente que celle de Fpg. En effet, la durée moyenne décrite pour exciser la base par OGG1 est d'environ 20 min et la demi-vie du site abasique généré est longue (2h) ^[79]. Dans nos conditions expérimentales OGG1 n'a pas le temps nécessaire pour créer une cassure dans le brin d'ADN mais peut-être le temps de générer un site abasique (qu'elle reconnaît lors de la 2^e injection).

➤ la concentration en magnésium de notre tampon diminue peut-être l'efficacité de OGG1 pour le clivage du brin d'ADN ; on sait que cette enzyme opère comme une glycosylase monofonctionnelle à des concentrations physiologiques de magnésium^[77].

V.4.2 Deuxième approche : révélation par la température

Nous avons comparé la stabilité thermique des oligonucléotides après l'action de l'enzyme. En préliminaire, nous avons vérifié que les oligonucléotides double-brin initialement hybridés sur la puce, sans lésion, avec 1 ou 2 lésions, sont stables à la température cible.

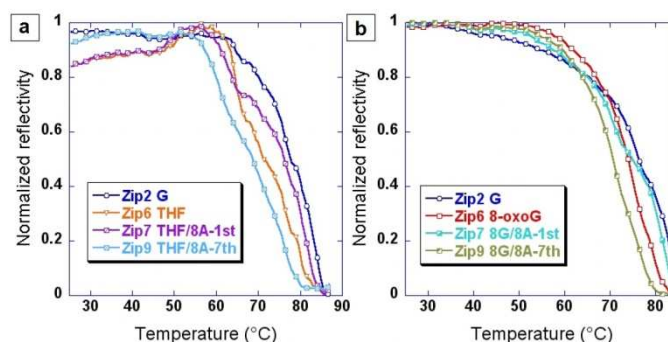


Figure 61 : Exemple de courbe de dissociation thermique
sur laquelle on observe la stabilité de nos oligonucléotides comportant soit une base THF (a), soit une base 8-oxoG (b) à la température appliquée dans notre protocole (45°C). Les deux autres zips sont hybridés avec des lésions tandem que nous étudierons ultérieurement.
La chute de réflectivité correspond à la fusion des deux brins d'ADN.

Si l'enzyme a eu une activité lyase, elle génère deux fragments de 7 et 14 bases (oligonucléotide initial de 22 bases) et ces fragments sont instables à 40°C.

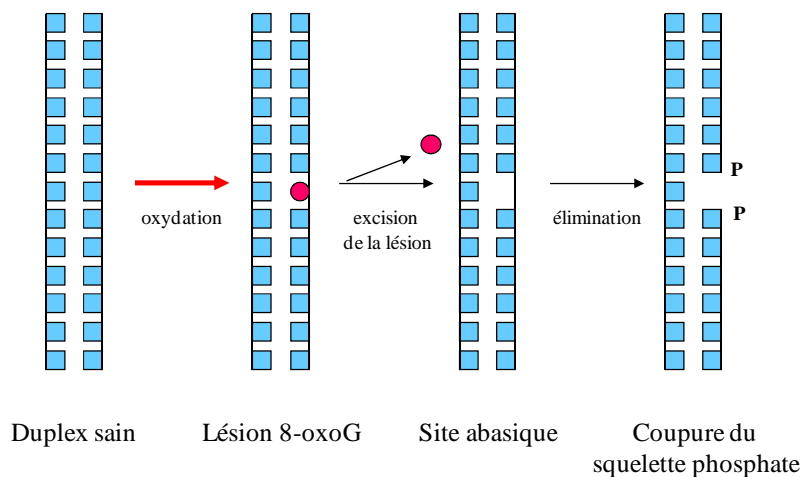


Figure 62 : Mécanisme simplifié de l'action de la Fpg sur la lésion 8-oxoG
D'après^[277].

Après l'injection de sel, la cellule de mesure est chauffée à 45°C (rampe de température à raison de 1°C par min).

Dans nos conditions expérimentales, ces deux fragments restent stables à 25°C et une détection directe par la mesure de la réflectivité est impossible. Cette élévation de température jusqu'à 45°C pourrait favoriser la dissociation sélective des duplex de petite taille sans entraîner la dissociation des autres duplex plus stables car comportant au minimum 22 paires de bases appariées.

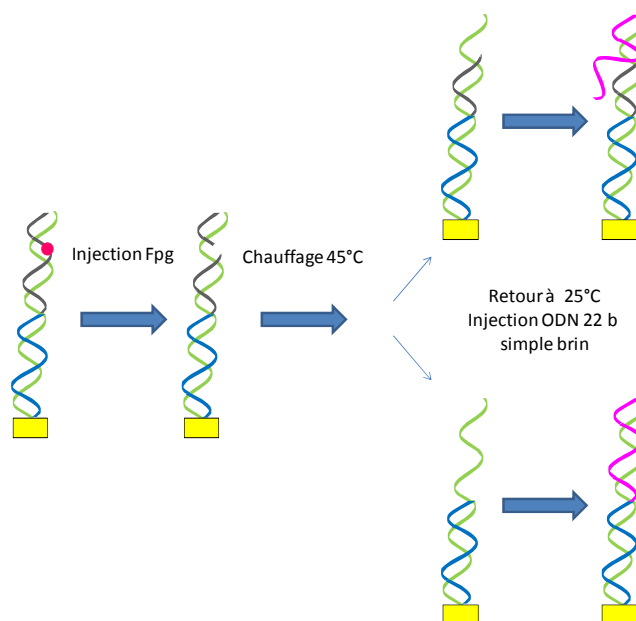


Figure 63 : Principe de révélation de l'activité enzymatique de la Fpg

sur notre biopuce. L'injection d'un oligonucléotide simple brin permet de visualiser une hybridation exclusivement sur le zipc précédemment hybridé à un oligonucléotide lésé. Nous ignorons si le chauffage à 45°C permet le départ complet ou partiel de l'oligonucléotide lésé par l'enzyme.

Après chauffage, la séquence zipc est accessible à un nouvel oligonucléotide donc l'injection d'un oligonucléotide de 22 bases et complémentaire de l'extrémité 5' du zipc (à 250 nM et 25°C) nous a permis de visualiser *a posteriori* l'action de l'enzyme ; la fixation spécifique de cet oligonucléotide signe l'action de l'enzyme.

Le prérequis de cette analyse étant bien entendu la présence exclusive de doubles-brins avant l'action de l'enzyme, nous l'avons vérifié par une injection préliminaire de l'oligonucléotide complémentaire 22mer qui ne se fixe à aucun spot.

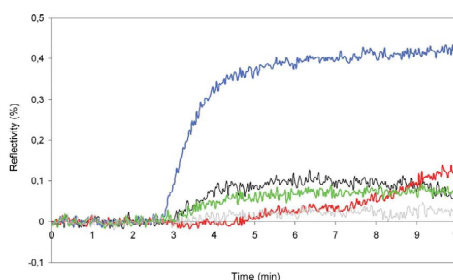


Figure 64 : Révélation de l'activité catalytique de la Fpg après chauffage

à 45°C. Le sensorgramme montre l'hybridation d'un oligonucléotide complémentaire. Noir polypyrrole, Gris ADN simple brin, Rouge ADN double brin sain, Bleu ADN comportant la base 8-oxoG, Vert ADN comportant la base CA.

Nous n'observons un signal spécifique que sur les plots concernés par l'activité catalytique de la Fpg, c'est-à-dire ceux comportant initialement la base 8-oxoG.

Si l'on suppose que la variation de réflectivité est proportionnelle à la masse des cibles hybridées sur la surface, nous avons eu l'idée d'estimer l'activité de la Fpg en comparant les signaux mesurés pendant l'hybridation de la puce et pendant la révélation.

Tableau XI : Estimation de l'activité Fpg

Concentration spotting en μM	Intensité mesurée durant l'hybridation de la puce : 69 bases	Intensité équivalente pour 22 bases	Intensité mesurée durant la révélation : 22 bases
10	1,39 +/- 0,04	0,44	0,40 +/- 0,04
2	1,18 +/- 0,04	0,38	0,37 +/- 0,04
1	0,65 +/- 0,04	0,21	0,24 +/- 0,04
0,5	0,40 +/- 0,04	0,13	0,18 +/- 0,04
0,25	0,17 +/- 0,04	0,05	0,13 +/- 0,04

Comparaison des intensités mesurées et calculées au cours de l'hybridation afin d'estimer l'activité Fpg.

Avec cette estimation, nous pouvons supposer que la totalité des lésions 8-oxoG a été éliminée par la Fpg. La technique de révélation en température permet donc la mise en évidence de l'activité enzymatique lyase mais aussi une estimation quantitative de son efficacité.

La même expérience a été tentée avec l'enzyme OGG1 mais le signal obtenu lors de l'hybridation après chauffage est très faible sur les plots contenant initialement 8-oxoG : environ 0,1 % de variation de réflectivité alors qu'elle était comprise entre 0,4 et 0,5 % pour l'action de la Fpg. De plus, le rapport signal/bruit n'est pas satisfaisant. Ce résultat reste donc à confirmer ; il serait peut-être utile d'augmenter la durée d'action de l'enzyme sur la puce (8 min d'injection suivies de 30 min de rinçage dans notre protocole).

V.4.3 Troisième approche : réaction de trapping avec le borohydrure de sodium

En présence de NaBH_4 , la Fpg se lie de manière covalente à l'ADN modifié par une base 8-oxoG^[8].

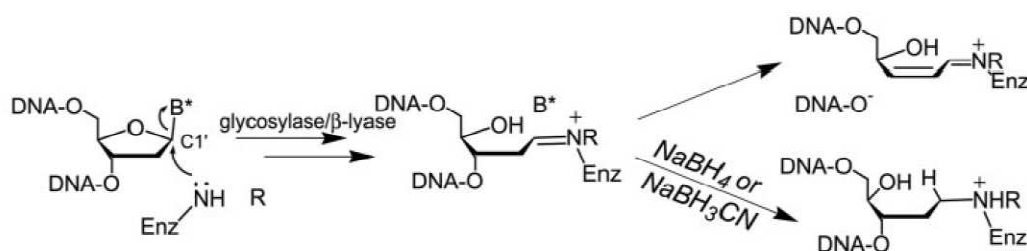
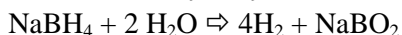


Figure 65 : Mécanisme d'action du NaBH_4
Selon^[25].

La base lésée (B^*) est lysée en $C1'$ avec l'action d'un atome d'azote de l'enzyme ; il y a formation d'un intermédiaire base de Schiff qui est normalement clivé. En présence d'agent réducteur, la liaison de la glycosylase est irréversible.

Nous avons réalisé ce test en modifiant le tampon lors de l'injection de la protéine (remplacement de KCl par NaBH₄ à la même molarité). Nous avons observé que toute hybridation est impossible en présence de ce tampon NaBH₄ ; il circule donc seulement dans le système au moment de l'injection des protéines. Précaution supplémentaire essentielle : le dégazage systématique de ce tampon d'une part par agitation sous hotte pendant minimum 5h et d'autre part par le dégazeur lié à notre dispositif. En effet, la molécule de NaBH₄ en milieu aqueux produit de l'hydrogène.

La réaction d'hydrolyse du borohydrure de sodium peut être décrite de la façon suivante :



Nous avons vu que la molécule de NaBH₄ provoque la réduction irréversible d'un intermédiaire réactionnel : la base de Schiff produite lors de l'ouverture du cycle du déoxyribose. Cette réaction est plus informative d'un mécanisme réactionnel que d'une réelle action *in vivo* car après la formation artificielle de cet adduit covalent, aucune autre réaction n'est possible. Seule la régénération totale de la puce avec NaOH 0,1M est envisageable.

Le résultat montre la formation d'une liaison covalente entre Fpg et la base 8-oxoG car c'est la seule interaction résistante à la modification de la force ionique du milieu.

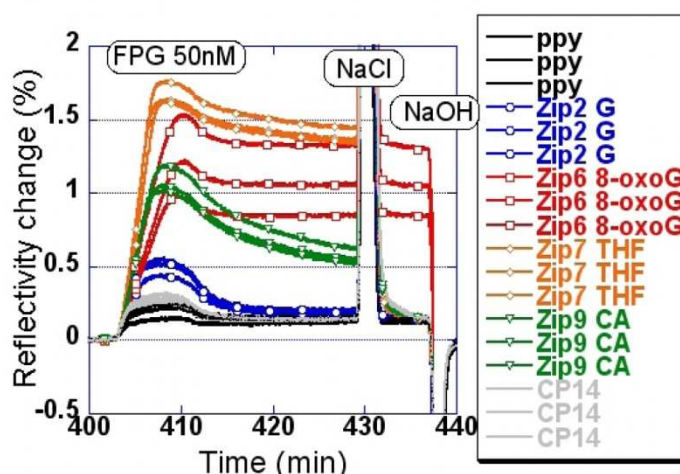


Figure 66 : « Trapping » de la Fpg sur la base 8-oxoG

dans le tampon comportant NaBH₄ à 100mM. Un rinçage par une solution de NaCl 1,5M ne permet pas d'éliminer la protéine Fpg liée à la lésion 8-oxoG.

Le mécanisme est en théorie similaire pour les deux enzymes Fpg et OGG1^[278] mais aucune interaction n'a été mise en évidence - à 2 reprises - avec l'enzyme OGG1, malgré la prolongation de la durée de réaction (30 min) et l'analyse à 37°C. Nous n'avons pas d'explication mais il est possible que le contact prolongé de l'enzyme avec ce tampon particulier modifie la structure ou les propriétés catalytiques de l'enzyme.

V.5 Amplification possible du signal

Dans le but d'augmenter la sensibilité de notre dispositif, nous avons cherché à augmenter l'intensité des signaux obtenus à deux moments différents dans l'analyse de l'interaction.

V.5.1 *Signal de fixation de la protéine à l'oligonucléotide*

Il a été montré ^[258] que l'injection d'un anticorps sur une surface présentant le complexe ADN/protéine permet la quantification de cette protéine.

Nous avons utilisé des anticorps polyclonaux (RetD Systems et Millipore) et monoclonaux (Interchim) anti-Fpg dans le but d'observer une variation de réflectivité liée à la formation des complexes ADN/Fpg/anticorps. L'objectif était double : d'une part amplifier notre signal et d'autre part permettre ultérieurement la détection spécifique de la Fpg liée à l'ADN après une injection d'extraits cellulaires. Différents protocoles ont été testés pour nos anticorps après injection de Fpg purifiée :

- ♦ Concentrations de 1/100 à 1/5000 dans notre tampon habituel
- ♦ Mêmes dilutions dans ce tampon sans DTT
- ♦ Mêmes dilutions dans notre tampon avec 1μM de cytochrome C
- ♦ Mêmes dilutions en tampon PBS
- ♦ Injections simultanées de la protéine Fpg en mélange avec l'anticorps anti-Fpg
- ♦ Prolongation des étapes de rinçage et diminution du débit afin de discriminer une éventuelle interaction.

Nous n'avons jamais observé une différence de signal due à l'anticorps. La densité de greffage est-elle trop importante pour permettre l'accès des molécules d'anticorps ?

Un test en Western Blot réalisé séparément avait montré que nos anticorps ne se fixaient que sur des enzymes commerciales et non sur l'enzyme utilisé habituellement dans notre protocole et fournie par le Dr S. Boiteux (CEA, Fontenay aux Roses). Cette approche a été abandonnée.

V.5.2 *Signal de révélation de l'activité après dissociation thermique*

L'utilisation d'oligonucléotides monobrins biotinylés injectés après l'action enzymatique et le chauffage est un artifice nous permettant d'amplifier le signal avec de la streptavidine.

Avant leur utilisation, nous avons montré que la biotine n'interférait ni sur la qualité de l'hybridation, ni sur les interactions avec l'enzyme Fpg.

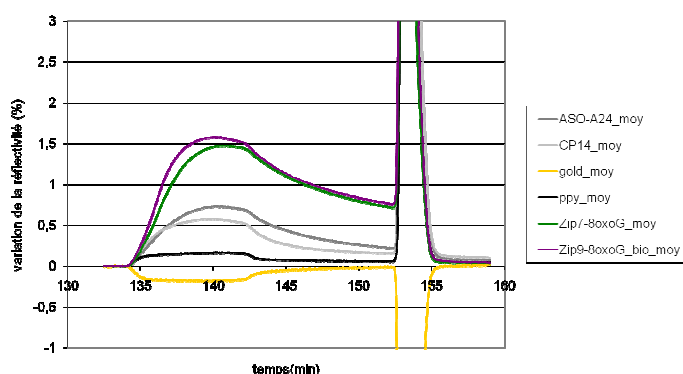


Figure 67 : Influence de la biotine

Sensorgramme montrant la liaison de la Fpg injectée à 200 nM sur 2 ODN comportant la lésion 8-oxoG, l'un biotinylé (courbe violette) et l'autre non (courbe verte).

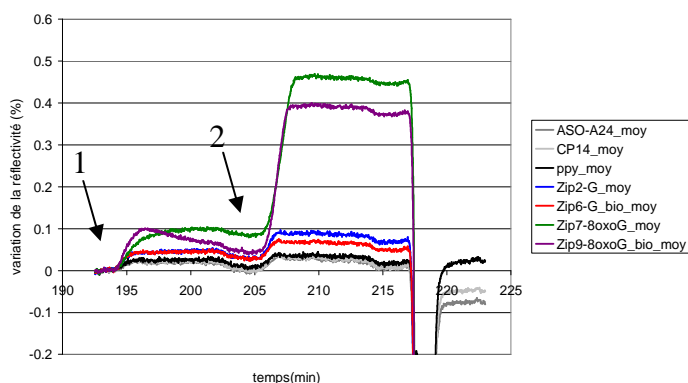


Figure 68 : Amplification du signal avec la streptavidine

(1) Injection d'un oligonucléotide complémentaire simple brin biotinylé (après l'action de l'enzyme Fpg et l'étape de chauffage) suivie d'une injection (2) de streptavidine. Ici, l'amplification du signal est très nette pour le zip7 et le zip9 correspondants aux sites de la base 8-oxoG, ce qui signifie qu'une hybridation a eu lieu, révélant une activité lyase et retrait de la base lésée par l'enzyme étudiée.

Cette amplification donne d'excellents résultats ; le signal d'hybridation initial est augmenté de 300 %.

V.6 Identification des protéines fixées

Comme la technique SPR n'est pas destructive, il est envisageable de collecter les protéines d'intérêt après élution et de les identifier par une technique de spectrométrie de masse.

Nous avons choisi une puce ne comportant que des plots hybridés avec une lésion (CA). Le choix de cette lésion est justifié par le fait que cette molécule n'est pas excisée par les enzymes utilisées. Elle nous sert de piège à protéine Fpg.

Afin d'éliminer les protéines se liant à L'ADN de manière non spécifique, l'expérience est menée en différentiel (une autre puce ne comporte que des oligonucléotides normaux). Nous avons injecté soit de l'enzyme Fpg purifiée, soit des extraits cellulaires *E. coli*.

Les tests ont été réalisés plusieurs fois et selon différentes modalités :

➤ Surface :

Soit avec un grand nombre de spots (48) créés par la méthode d'électropolymérisation du pyrrole.

Soit totalement recouverte d'oligonucléotides de manière à obtenir un maximum de capture ; nous utilisons ici des ODN thiolés permettant de couvrir la surface à raison de 20 pmol d'oligonucléotides/cm², la surface du prisme étant d'environ 1 cm².

➤ Elution :

Soit la solution saline est injectée dans le dispositif SPRI et les protéines sont collectées en sortie. Nous avons au préalable mesuré précisément le temps d'élution entre le passage dans la cellule de mesure et la sortie du système, à l'aide d'une solution colorée : 1 min et 20 sec.

Soit le prisme est sorti de l'appareil et incubé avec une goutte de trypsine à 37°C pendant 30 min. Comparée aux autres enzymes la trypsine est souvent choisie car elle tolère de petites quantités de détergents et nécessite un pH de 8 pour une action enzymatique optimale ^[227].

La solution est ensuite récupérée à la pipette pour une identification en spectrométrie de masse.

La Fpg a pu être identifiée par spectrométrie de masse quelle que soit la concentration injectée (25, 50 ou 100 nM). Mais dans tous les cas les résultats de spectrométrie de masse sur extraits cellulaires ne sont pas concluants pour des raisons de sensibilité de la technique. Le rapport signal/bruit obtenu est en effet très faible.

VI DISCUSSION SUR LES RESULTATS OBTENUS VIS-A-VIS DES DIFFERENTES LESIONS

Ces résultats ne concernent que des protéines enzymatiques purifiées car avec les extraits cellulaires, nous n'avons pas pu détecter ni la reconnaissance éventuelle de certaines lésions, ni l'action enzymatique potentielle des protéines injectées.

VI.1 Dans le cas d'un site lésé unique

Tableau XII : Tableau récapitulatif des actions des 3 enzymes purifiées sur 4 lésions isolées

	8-oxoG	CA	THF	C3
Fpg	coupure	liaison	liaison	liaison
OGG1	Pas d'action spécifique	Pas d'action spécifique	DM	DM
EndoIV	Pas d'action spécifique	DM	coupure	coupure

DM : données manquantes pour notre étude en SPRI

➤ 8-oxoG

La SPRI détecte l'activité de la Fpg sur cette base, comme décrite dans la littérature (glycosylase bifonctionnelle ^[27]). Comme nous l'avons vu précédemment, le rôle biologique essentiel de la Fpg est le retrait des bases endommagées par les espèces réactives de l'oxygène ; elle forme dans un premier temps un site abasique en coupant la liaison N-glycosidique puis dans un deuxième temps une rupture de la chaîne oligonucléotidique en coupant la liaison phosphodiester. Nous visualisons la rupture de la chaîne d'ADN avec l'artifice de chauffage qui révèle la fragilité du site concerné.

Notre attente se portait sur une réaction similaire avec l'enzyme OGG1 mais nous ne l'avons pas observée. Il a été décrit une activité de OGG1 quatre-vingt fois plus faible que celle de la Fpg vis à vis de la lésion 8-oxoG ^[75].

➤ Cycloadénine

On observe une liaison de l'enzyme Fpg à la CA. Cette lésion pourrait avoir un rôle de piège vis-à-vis de la Fpg. Celle-ci restant fixée à la CA, elle devient incapable de détecter d'autres lésions afin d'initier le processus de réparation (inhibiteur endogène de Fpg).

➤ THF et C3

Ces structures chimiques nous permettent d'étudier le comportement des enzymes vis-à-vis des sites abasiques mais les résultats devront toutefois être interprétés avec précaution car l'enzyme n'est pas en présence de vrais sites abasiques, trop instables. Une création de site abasique vrai a été tentée extemporanément, par l'enzyme UDG sur une base Uracile. Le protocole était différent, en particulier pour la composition du tampon. L'activité lyase de la Fpg a bien été observée sur ce site abasique vrai mais l'expérience n'a pas été répétée ; nous ne tiendrons pas compte de ces résultats ici.

En revanche, le comportement de la Fpg vis-à-vis de THF et C3 a été confirmé. L'affinité de la Fpg est plus forte pour ces deux modifications que pour CA, l'interaction avec THF étant supérieure à celle de C3.

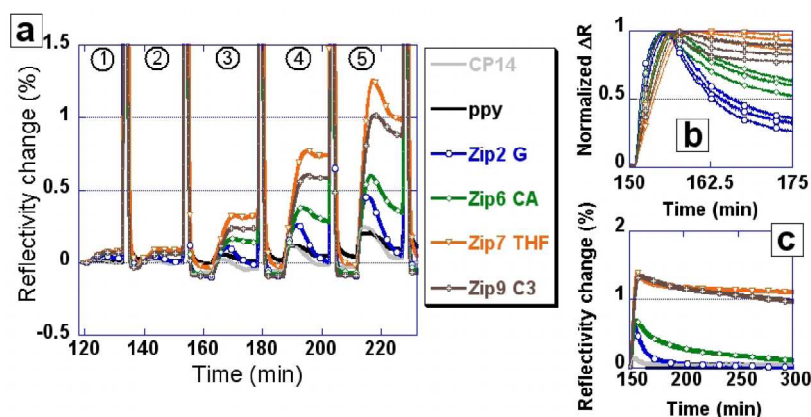


Figure 69 : Fpg et sites abasiques

a) Injections successives de la protéine Fpg à différentes concentrations de ① à ⑤ : 6,25nM, 12,5nM, 25nM, 50nM et 100nM. Régénération par NaCl 1,5M entre chaque injection. b) signal normalisé. c) dissociation de la protéine Fpg pendant 2h30. On observe la stabilité de Fpg sur les sites abasiques.

Bien que les bases CA, THF et C3 ne soient pas des substrats vis-à-vis de la Fpg, elles ont la capacité de se lier fortement à l'enzyme. Une autre expérience a été menée sur une nuit et après 18h de rinçage, il persiste un signal sur les plots contenant C3 et THF alors que le complexe Fpg/CA s'est dissocié. Nous montrons ici la grande stabilité du complexe Fpg/sites abasiques.

Ces résultats sont en accord avec la toxicité potentielle de ces modifications, piégeant une enzyme de réparation à leur niveau, tout en restant elles-mêmes non réparées.

Ces courbes peuvent être rapprochées du signal stable obtenu lors d'une injection de Fpg mutée. Cette dernière conserve théoriquement son activité de reconnaissance de la base 8-oxoG mais n'exerce plus son activité enzymatique. A noter toutefois que cette protéine n'est pas dissociée par une injection de sel, à la différence des conditions précédentes.

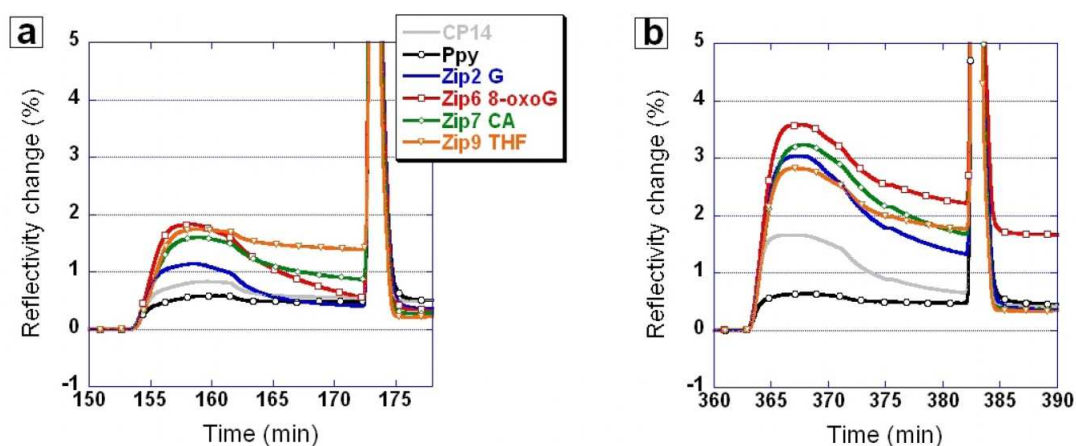


Figure 70 : Test de Fpg mutée

a) Injection de la protéine Fpg à 50nM. b) injection de la protéine Fpg mutée à 500 nM.

L'étape ultérieure d'injection de l'oligonucléotide simple brin après action de l'enzyme mutée ne montre aucun signal d'hybridation, résultat (non montré) attendu puisque l'activité lyase est inhibée.

Il existe des endonucléases capables d'agir sur les sites abasiques (représentés dans notre étude par les sites THF et C3). Nous avons étudié l'action de EndoIV, une enzyme issue d'*E. coli* qui possède des propriétés 3' AP-endonucléase et 3'-5' exonucléase ^[279]. Les signaux d'interactions observés sont faibles malgré la quantité d'enzyme injectée (estimée à environ

130 nM). A la différence de la Fpg, Endo IV reste même fixée aux lésions THF et C3 après l'injection de sel. La révélation indirecte de l'activité enzymatique par l'injection d'un oligonucléotide simple brin après chauffage montre une action spécifique sur les plots contenant initialement THF et C3, avec un signal plus intense pour THF.

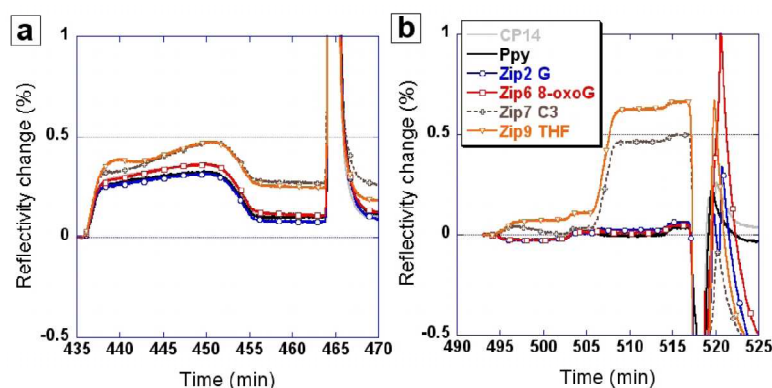


Figure 71 : Action de Endo IV sur les sites abasiques

a) Injection de la protéine EndoIV à 4 UI/ml. b) Révélation de l'activité par injection d'un oligonucléotide biotinylé après chauffage, réaction amplifiée par la streptavidine. Seuls les plots contenant initialement THF et C3 ont réagi, ce qui montre l'activité lyase de EndoIV sur ces deux lésions.

VI.2 Dans le cas de lésions tandem

Des lésions multiples peuvent se former dans l'ADN, particulièrement après expositions aux radiations ionisantes^[96]. Ces lésions sont supposées constituer un réel défi pour les mécanismes de réparation car chaque lésion peut modifier localement les propriétés de la double hélice. L'inhibition de réparation la plus forte est souvent montrée quand la seconde lésion est proche de la lésion initiale, mais sur le brin complémentaire^[103].

Très peu d'études ont été menées sur des lésions multiples localisées sur le même brin d'ADN : on parle alors de lésions « tandem ». Le premier article traitant de l'action d'extraits cellulaires humains sur deux lésions tandem date de 2005^[280] et montre déjà que la réparation dépend de la position relative des 2 bases altérées.

La publication de l'équipe de P. O'Neill^[107] s'intéresse à ce type de lésions avec une méthode d'analyse par gel. Ils montrent ainsi que l'excision d'un site abasique par la protéine Fpg est diminuée en présence de 8-oxoA, même si celle-ci est à une distance de quatre bases, côté 5' ou côté 3'. Quant à l'action de Ape1, elle est influencée par la lésion tandem 8-oxoA si celle-ci est localisée en 3' du site abasique et à une distance qui n'excède pas deux bases. La même équipe a également étudié l'action d'extraits nucléaires sur un site abasique à proximité d'une base 8-oxoG^[108] et même sur un double-brin comportant deux lésions tandem sur un brin et une base Uracile sur l'autre brin^[110].

Selon un modèle similaire, nous nous sommes intéressés à l'influence d'une base oxydée (8-oxoA) située en tandem de deux de nos lésions précédemment étudiées (8-oxoG ou THF) et nous l'avons positionnée soit juxtaposée, soit à sept bases de distance, côté 3' (cf tableau IX). Cette base oxydée (8-oxoA) n'est pas excisée par les enzymes utilisées. Nous savons que la Fpg reconnaît et excise la lésion diaminofornamidopyrimidine avec une adénine (FapyA) mais elle n'a pas d'action sur une base 8-oxoA car celle-ci possède un

cycle imidazole fermé qui pourrait contribuer à son manque de flexibilité et donc à son inaccessibilité ^[62].

VI.2.1 Etude de Fpg

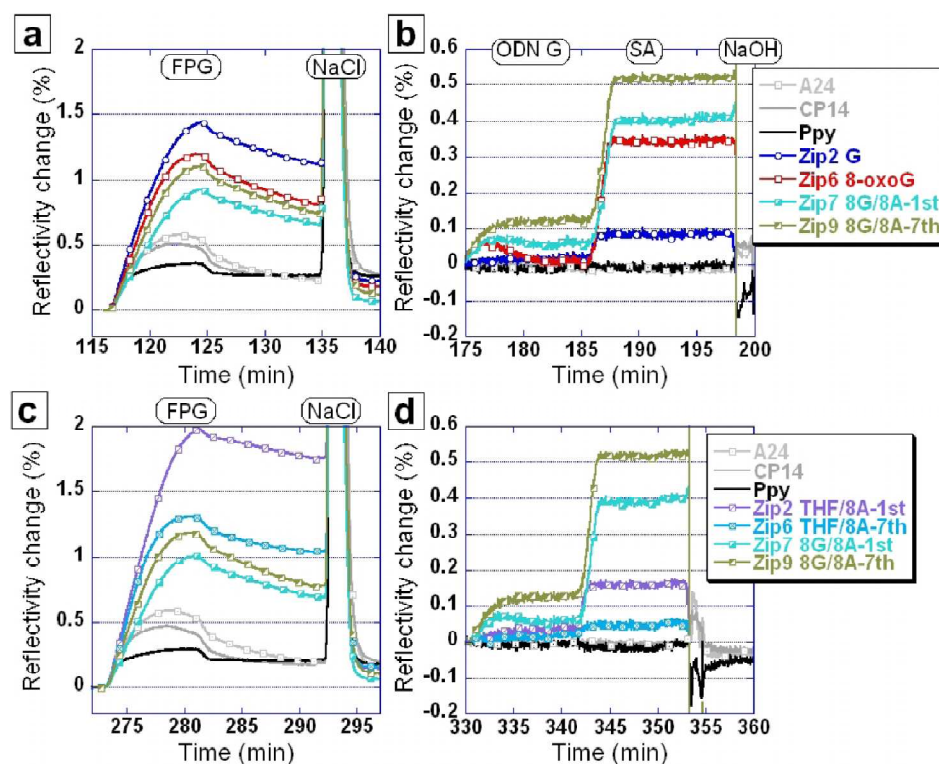


Figure 72 : Action de l'enzyme Fpg sur nos lésions tandem

a et c : injection de la Fpg à 200 nM à 25°C suivie d'une injection de sel, b et d : révélation de l'activité lyase après rampe thermique (45°C) avec injection de l'oligonucléotide simple brin biotinylé et injection de streptavidine.

En a et b, l'action sur les lésions tandem comportant la base 8-oxoG peut être comparée à l'action sur la base 8-oxoG seule ou sur l'ODN double brin sans lésion. L'activité de coupure est maximale si les deux lésions sont distantes de 7 bases.

En c et d, nous étudions l'action de la Fpg sur 4 lésions tandem différentes. Nous retrouvons l'activité de coupure maximale sur les mêmes lésions tandem.

L'ensemble de ce travail a été réalisé sur la même puce avec des signaux d'hybridation identiques.

Les oligonucléotides comportant les lésions tandem ont été choisis avec une molécule de biotine car notre volonté initiale était de détecter l'activité enzymatique de manière plus directe, sans avoir besoin de l'étape de chauffage. Nous espérions observer un signal différentiel entre les oligonucléotides intacts et clivés avec l'injection de streptavidine. Mais le signal équivalent obtenu nous a montré que, malgré l'action de la Fpg, l'oligonucléotide restait dans sa configuration double-brin à 25°C, et ceci malgré la présence d'une 2^e lésion proche.

Notre protocole se déroule donc avec des étapes supplémentaires car la présence d'une biotine à l'extrémité des brins comportant les lésions tandem pourrait être considérée comme une contrainte. Mais cette difficulté peut être contournée avec une injection préalable de streptavidine :

Après action de l'enzyme et la dénaturation thermique potentielle, nous injectons :

- ♦ De la streptavidine à 10 nM afin de saturer l'ensemble des biotines présentes sur le système
- ♦ L'oligonucléotide simple brin biotinylé qui se localisera uniquement sur les simples brins existants c'est-à-dire où l'activité lyase aura eu lieu
- ♦ De la streptavidine pour amplifier ce signal d'hybridation (toujours très faible, de l'ordre de 0,1 %).

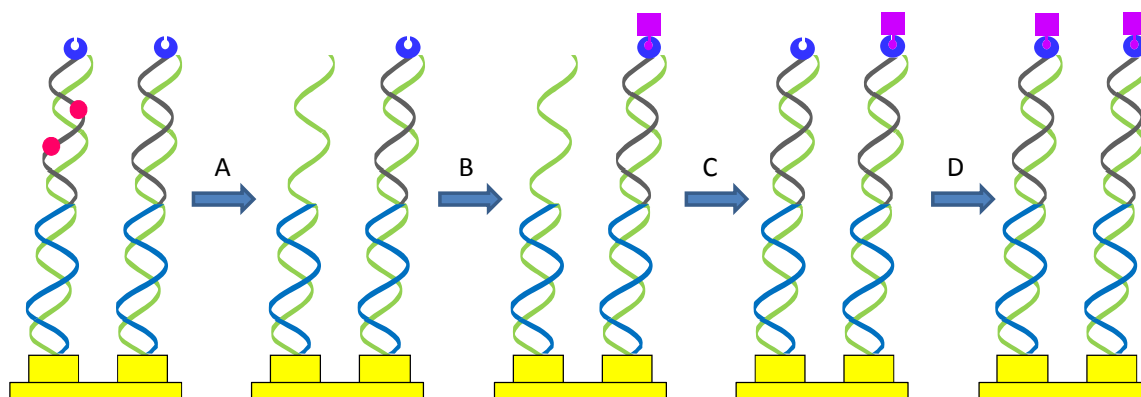


Figure 73 : Représentation schématique de notre protocole avec des oligonucléotides biotinylés
Exemple d'une puce comportant d'une part un oligonucléotide témoin sain et d'autre part un oligonucléotide avec 2 lésions tandem (symbolisées par les 2 ronds de couleur rouge). Lors de l'hybridation initiale, nous avons choisi des oligonucléotides 22mer biotinylés (biotine = boule bleue).
A : Action de l'enzyme puis chauffage à 45°C
B : Injection de streptavidine (cube violet)
C : Injection d'un 22mer simple brin biotinylé
D : Injection de streptavidine
Le signal amplifié correspond exclusivement à l'hybridation qui a lieu à la place de l'oligonucléotide lysé par l'enzyme.

VI.2.1.1 Interprétation du signal d'injection de Fpg

Le changement de réflectivité est important (jusqu'à 2%) et le signal obtenu avec les 2 lésions THF/8A juxtaposées se distingue des autres sensorgrammes par son intensité plus importante. Lors de l'étape de dissociation, une différence plus subtile peut être remarquée sur les plots de zip7 (8G/8A juxtaposées) pour lesquels la dissociation semble plus lente. Peut-on supposer une activité enzymatique ralentie à cause de la 2^e lésion à proximité ? Quoi qu'il en soit, nous n'observons pas la stabilité de la Fpg constatée antérieurement sur une lésion THF unique. Ce phénomène est peut-être lié à la dissociation de la Fpg liée à la base 8-oxoA.

VI.2.1.2 Interprétation du signal d'hybridation

Ce signal est le reflet de l'activité lyase de l'enzyme.

L'activité lyase de la Fpg est maximale sur le tandem 8G/8A séparés de 6 bases. Peut-on imaginer qu'une 2^e lésion sur le brin comportant la 8-oxoG facilite le recrutement de l'enzyme de réparation ? A cette distance, les lésions sont en réalité très proches (enroulement de la double hélice). La présence d'une seconde anomalie pourrait faciliter la reconnaissance de la première. Cette hypothèse est justifiée si les deux lésions sont séparées de 6 bases car le signal obtenu pour une lésion 8-oxoG seule ou juxtaposée à une base 8-oxoA est similaire ; on ne montre pas une différence d'activité enzymatique de la Fpg face à ces deux lésions tandem très proches (en comparaison d'une lésion 8-oxoG unique).

Les résultats de la littérature ^[107] ont montré une activité lyase de Fpg diminuée en cas de lésion tandem : site abasique/8-oxoA, le site abasique pouvant provenir soit de l'effet direct des radiations ionisantes soit du retrait d'une base lésée par une glycosylase.

Ces résultats sont-ils en contradiction avec les nôtres ? Des études complémentaires sont nécessaires car sur nos oligonucléotides, nous étudions la base 8-oxoG et non un site abasique. Par ailleurs, le dispositif analytique est très différent d'une part vis-à-vis de l'activité enzymatique (10 min versus 1h) et d'autre part vis-à-vis de la disponibilité spatiale des molécules (oligonucléotides immobilisés versus milieu liquide). Notre travail représente en effet la première étude de réparation des lésions tandem par SPRI.

Un signal parasite est observé sur le zip2 due à l'hybridation croisée observée entre zip2c et zip7c. Le résultat le plus surprenant est l'action enzymatique lyase de la Fpg obtenue sur le couple THF/8A. En effet, nous avons vu précédemment que les sites abasiques et la base 8-oxoA peuvent jouer le rôle de ligand pour la Fpg mais ne constituent pas des substrats pour cette enzyme. Nous avons également vérifié la stabilité thermique de ces oligonucléotides dans les conditions de notre étude. On peut donc supposer une petite activité lyase de la Fpg sur ces substrats *in vitro*.

VI.2.2 Etude de EndoIV

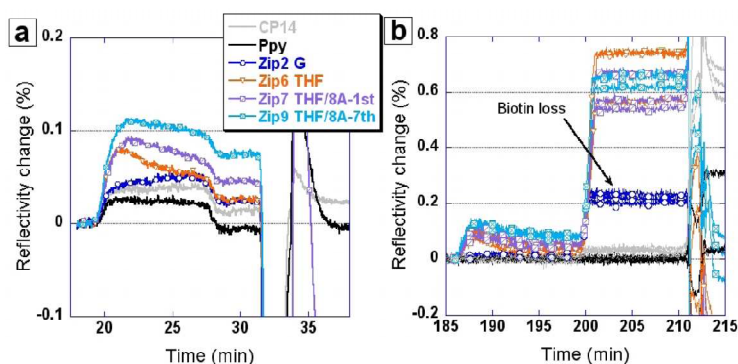


Figure 74 : Action de l'enzyme EndoIV sur nos lésions tandem

a : injection de Endo IV à 4U/ml pendant 30 min, b : révélation de l'activité enzymatique par injection d'un oligonucléotide biotinylé puis injection de streptavidine.

Un signal très faible est obtenu comme précédemment (0,1%) lors de l'injection de l'enzyme EndoIV.

Après injection de sel et chauffage, nous injectons un oligonucléotide simple brin biotinylé. Comme nous savons que EndoIV a la propriété de couper l'analogue de site abasique THF, le résultat attendu lors de l'injection de streptavidine est un signal positif sur les quatre spots (zips 6, 7 et 9 pour la coupure et zip2 car la biotine était initialement présente).

La révélation de l'activité enzymatique nous montre une action maximale de EndoIV sur une lésion THF unique et légèrement diminuée en cas de 2^e lésion présente. Mais comment expliquer le signal très faiblement positif (0,2%) obtenu pour l'ADN sain lors de l'injection de streptavidine ? Ce signal n'est pas lié à l'hybridation du simple brin (nulle sur ces plots) ; la seule explication possible réside dans l'hypothèse d'une perte antérieure de biotine sur ces plots. Quelle est l'action de l'enzyme EndoIV sur les oligonucléotides biotinylés ?

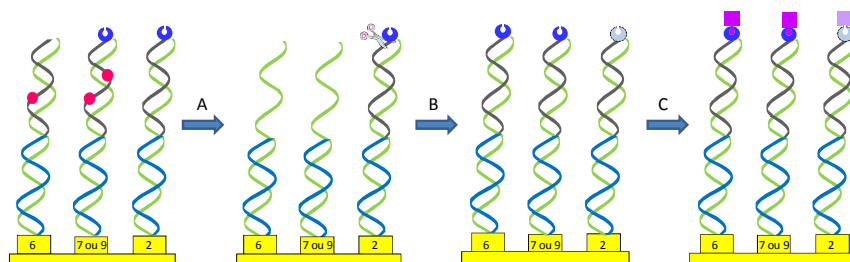


Figure 75 : Hypothèse expliquant les résultats obtenus avec l'enzyme EndoIV

et nos oligonucléotides biotinylés. Le zip6c est hybridé avec une lésion THF unique (nous ne disposons pas de l'oligonucléotide biotinylé pour cette lésion). Les zips 7c et 9c comportent THF et 8-oxoA en tandem. Le zip 2c est hybridé avec un oligonucléotide sans lésion.

A : action de l'enzyme EndoIV suivie d'une rampe thermique jusqu'à 45°C. Notre hypothèse concerne la coupure de la biotine par Endo IV.

B : injection d'un oligonucléotide simple brin biotinylé

C : Injection de streptavidine

Une expérience a été réalisée en gel retard pour visualiser l'action de 3 enzymes utilisées au cours de cette étude ; elle confirme une activité de coupure de la biotine avec EndoIV.

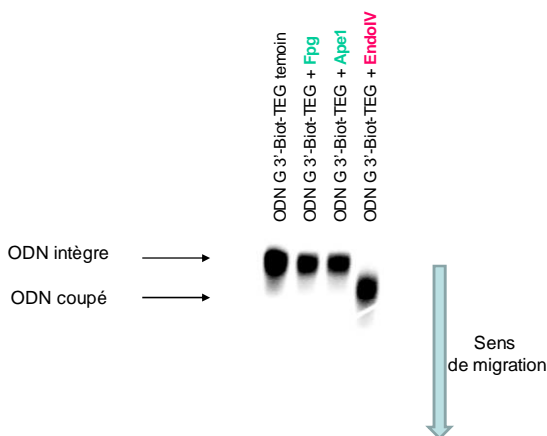


Figure 76 : Résultat d'un gel retard

réalisé avec des oligonucléotides non lésés et marqués au ^{32}P et incubés pendant 30min à 37°C avec 3 enzymes différentes.

Si l'on regarde la structure de la biotine liée à l'extrémité 3'P des séquences, la liaison formée pourrait mimer un site reconnu et coupé par EndoIV. La liste des dommages reconnus par EndoIV fait l'objet d'une publication ^[281]. Ici, il s'agirait d'une activité 3'exonucléase. En effet, des analyses complémentaires ont été réalisées avec d'autres

oligonucléotides et ont montré cette activité de EndoIV. Une publication de 2003 ^[279] suppose même que cette fonction 3' exonucléase pourrait être significative *in vivo*.

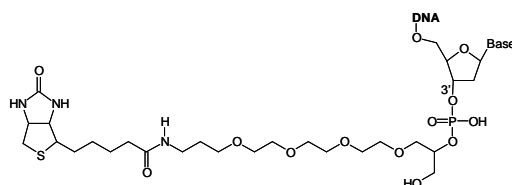


Figure 77 : Structure de la biotine
couplée à l'extrémité 3' de nos oligonucléotides par une molécule de TEG.

A notre connaissance, c'est la première fois qu'il est constaté une action de l'enzyme EndoIV sur des oligonucléotides biotinylés et cette interaction mérite d'être connue car elle peut être responsable de nombreux artefacts techniques.

VI.2.3 Etude de OGG1

Comme précédemment, les résultats obtenus avec l'enzyme OGG1 ne sont pas concluants (faible signal inférieur à 0,2% et nombre insuffisant d'expériences).

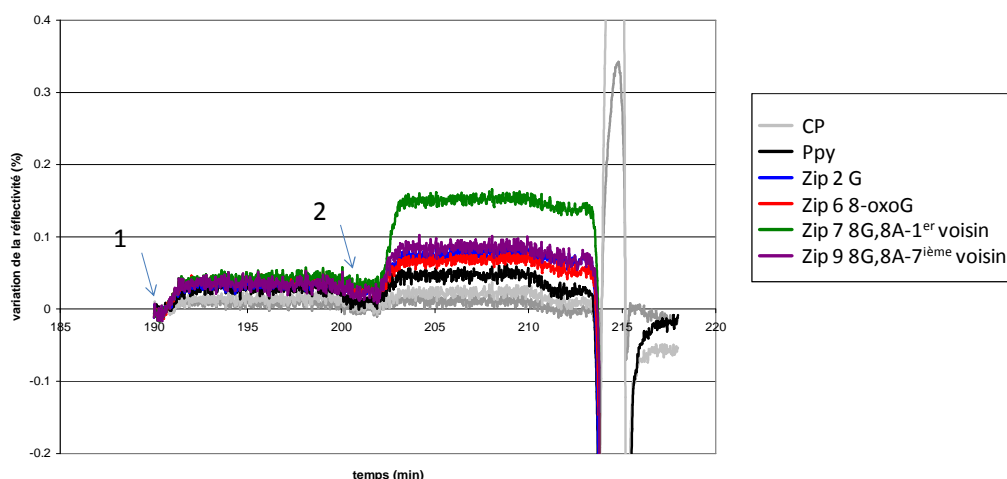


Figure 78 : Résultat de l'action de OGG1 sur les lésions tandem
(après un contact de 30 min à 37°C). Injection de l'oligonucléotide simple brin biotinylé (1) suivie d'une injection de streptavidine (2). On observe un très faible signal sur l'oligonucléotide comportant initialement les 2 lésions très proches.

On peut s'interroger sur l'activité AP lyase de OGG1 dans notre système. Une explication potentielle est qu'une action combinée glycosylase/lyase de OGG1 *in vivo* pourrait créer de très nombreuses cassures simple-brin dans le génome. Son action peut en revanche être bénéfique si sa forte liaison aux sites abasiques protège ces lésions de l'attaque d'autres endonucléases. Donc OGG1 pourrait avoir un rôle protecteur jusqu'à ce que d'autres enzymes comme Ape1 soient recrutées ^[78]. D'après les travaux de Vidal, la demi-vie du complexe 8-oxoG/OGG1 est supérieure à 2 heures ^[79]. Dans ce contexte, l'action simultanée de deux enzymes est une approche intéressante.

VI.2.4 Etude de l'action couplée de 2 enzymes

Afin d'améliorer les performances de la réparation, nous avons choisi deux couples enzymatiques ; un système Procaryote Fpg/EndoIV et un système Eucaryote OGG1/Ape1.

La guanine oxydée est reconnue par les glycosylases (Fpg ou OGG1) qui initient la réparation avec l'excision de la base et donc la formation d'un site abasique. Leur activité lyase leur permet d'éliminer ce site abasique. Dans le cas de OGG1, le produit final est un résidu aldéhyde qui doit être retiré pour permettre l'action d'une ADN polymérase ; dans les cellules humaines, c'est l'enzyme Ape1 qui assure cette fonction.

En pratique, nous injectons la première enzyme aux concentrations habituelles. Après un rinçage de 8 minutes, la deuxième enzyme est injectée et le protocole habituel est ensuite appliqué.

➤ Couple Fpg/EndoIV

L'activité de coupure de la base 8-oxoG observée avec le couple Fpg/EndoIV semble supérieure à celle observée avec Fpg seule (signal d'hybridation de 0,5% versus 0,9% sur les figures 72b et 79b). On peut supposer que de nombreux sites abasiques sont créés lors de la première étape mais la durée d'action de la Fpg semble insuffisante pour observer une activité lyase, celle-ci est facilitée par EndoIV. Nous pouvons donc constater l'action séquentielle de ces deux enzymes, conforme aux résultats de la littérature et confirmée récemment ^[282].

➤ Couple OGG1/Ape1

Il a été montré que sous l'action d'un stress oxydant important et la présence de base 8-oxoG, la quantité de protéine OGG1 n'augmente pas mais son activité est majorée par la présence de la protéine Ape1 dans les cellules, dont la synthèse semble induite par un stress oxydant. Il est probable que Ape1 favorise la dissociation de OGG1 qui reste liée au site abasique ^[283]. Une autre étude précise que l'activité OGG1 est multipliée par cinq en présence de Ape1 ^[78]. Sur le plan cinétique, les sites abasiques formés par OGG1 sont rapidement occupés par Ape1, empêchant la réassociation de OGG1 et la rendant disponible pour d'autres actions enzymatiques ^[79].

Grâce à cette synergie, nous observons pour la première fois l'activité de OGG1, faible sur la lésion 8-oxoG seule mais nettement majorée par la présence d'une lésion 8-oxoA en tandem, particulièrement si les deux lésions sont proches.

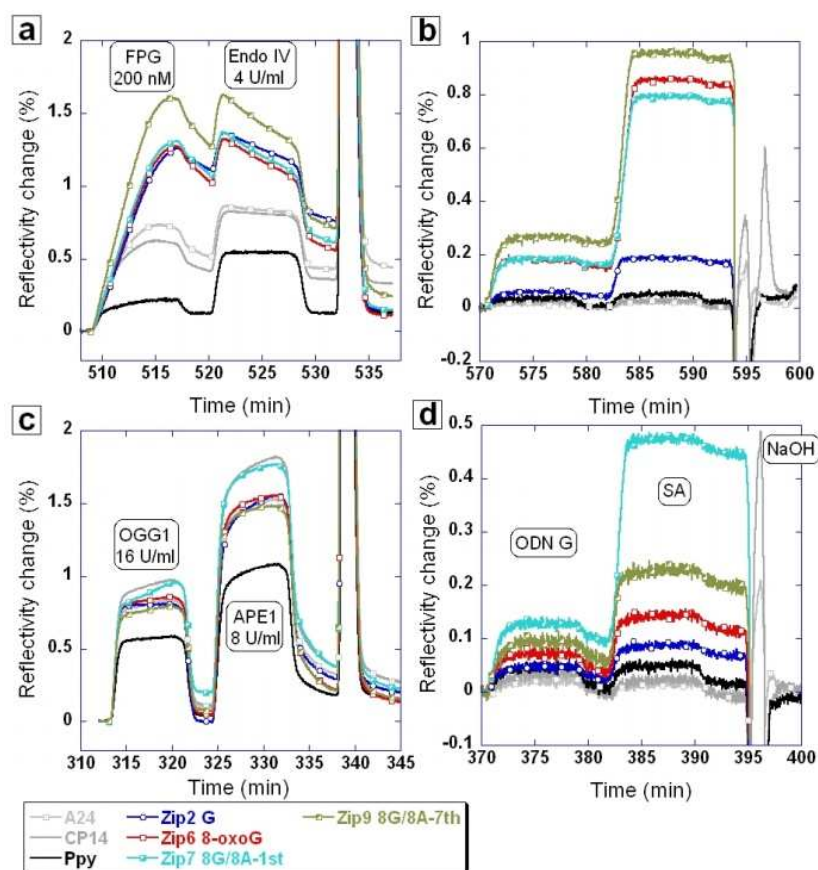


Figure 79 : Action couplée de 2 enzymes sur nos lésions tandem

a : injection de Fpg à 200 nM suivie de Endo IV à 4U/ml, c : injection de OGG1 à 16 U/ml suivie de Ape1 à 8U/ml, b et d : révélation de l'activité enzymatique par injection d'un simple brin complémentaire biotinylé suivie de l'injection de streptavidine.

L'ensemble de ces résultats devra être confirmé par un gel d'électrophorèse avec nos oligonucléotides marqués au ^{32}P mais en résumé nous pouvons déjà souligner l'activité du couple enzymatique OGG1/Ape1 dont l'action est plus importante sur les deux lésions juxtaposées. A l'inverse, l'enzyme Fpg seule ou en association avec EndoIV semble plus efficace si les deux lésions sont distantes de 7 bases.

Tableau XIII : Récapitulatif des résultats obtenus sur nos lésions tandem

	Base témoin	8G/8A	8G~~~~8A	THF/8A	THF~~~~8A
Fpg	8G : ++	++	+++	+	+/-
EndoIV	THF : +++	NA	NA	+	++
Fpg + EndoIV	8G : ++	++	+++	NA	NA
OGG1 + Ape1	8G : ++	+++	++	NA	NA

NA : non applicable

/ : 2 lésions juxtaposées

~~~~ : 2 lésions séparées de 6 bases



## VII PERSPECTIVES

Il s'agit de la première étude de ce type par SPRI et nous devons donc confirmer les résultats obtenus (en particulier sur lésions tandem) par d'autres techniques.

Par ailleurs, avant d'envisager d'autres applications à partir d'enzymes purifiées ou d'extraits cellulaires, il est nécessaire d'améliorer le dispositif fluidique de manière à diminuer le volume de la boucle d'injection. En effet, le volume minimal à injecter est actuellement d'environ 1 µl.

Nous avons montré que notre dispositif permettait la visualisation d'activités de réparation de l'ADN. La possibilité de greffer plusieurs séquences oligonucléotidiques différentes, comportant une ou plusieurs bases lésées, nous procure un système très versatile sur lequel les combinaisons d'interactions parallélisées sont infinies. De plus, les protéines analysées peuvent être injectées de manière concomitante ou séquentielle, ce qui nous permet d'envisager de nombreux modèles d'interaction *in vitro*.

La perspective la plus séduisante concerne l'injection d'extraits cellulaires sur différentes lésions immobilisées afin d'une part de visualiser le résultat potentiel de l'interaction (coupure de la séquence oligonucléotidique) et d'autre part d'identifier des protéines de liaison spécifiques en spectrométrie de masse. A terme, cet outil pourrait permettre d'étudier la capacité de chaque individu ou d'un groupe de population à réparer un panel de lésions définies. L'interprétation concernerait alors un profil protéique global issu de l'analyse SPRI, assimilable à un résultat d'analyse protéomique.



## CONCLUSION

Ce travail ne représente que la première étape de mise au point et de validation d'un dispositif puissant et versatile pour l'étude des interactions ADN/protéine en temps réel.

Tous les paramètres de la technique sont à présent validés : la préparation de la puce et les densités d'oligonucléotides, les réglages optiques en SPRi, les matériaux concernant la fluide, le blocage des surfaces, le tampon utilisé et son débit, les températures optimales pour les différentes étapes, les conditions de régénération de la puce. L'ensemble des difficultés rencontrées nous a orientés vers une amélioration progressive de notre dispositif.

Les résultats obtenus sont encourageants. Ils nous ont permis de révéler et amplifier une activité enzymatique de plusieurs protéines de réparation (Fpg, EndoIV et Ape1) sur notre biopuce à ADN dans le cas d'une lésion unique ou de lésions multiples. De plus, nous avons mis en évidence un artefact technique non décrit jusqu'à présent dans la littérature : l'action de l'enzyme EndoIV sur un oligonucléotide biotinylé.

Ces travaux devront être poursuivis avec l'étude d'extraits cellulaires et la perspective d'identifier de nouvelles protéines.

## RÉFÉRENCES

- 1 Lindahl, T. and Wood, R.D., *Quality control by DNA repair*.  
Science, 1999. **286**(5446): 1897-905.
- 2 Cadet, J., Douki, T., Badouard, C., et al. (2007). *Oxidative Damage to Nucleic Acids*.  
Georgetown: Evans MDCooke MS.
- 3 Guetens, G., De Boeck, G., Highley, M., et al., *Oxidative DNA damage : biological significance and methods of analysis*.  
Crit Rev Clin Lab Sci, 2002. **39**(4-5): 331-457.
- 4 Favier, A., *Le stress oxydant ; Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique*.  
L'actualité chimique 2003: 102-109.
- 5 Krokan, H.E., Standal, R., and Slupphaug, G., *DNA glycosylases in the base excision repair of DNA*.  
Biochem J, 1997. **325**: 1-16.
- 6 Blainey, P.C., van Oijen, A.M., Banerjee, A., et al., *A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA*.  
Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(15): 5752-7.
- 7 Buchko, G.W., McAteer, K., Wallace, S.S., et al., *Solution-state NMR investigation of DNA binding interactions in Escherichia coli formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) : a dynamic description of the DNA/protein interface*.  
DNA Repair (Amst), 2005. **4**(3): 327-39.
- 8 Nash, H.M., Bruner, S.D., Scharer, O.D., et al., *Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily*.  
Curr Biol, 1996. **6**(8): 968-80.
- 9 Zharkov, D.O., Ishchenko, A.A., Douglas, K.T., et al., *Recognition of damaged DNA by Escherichia coli Fpg protein : insights from structural and kinetic data*.  
Mutat Res, 2003. **531**(1-2): 141-56.
- 10 Maynard, S., Schurman, S.H., Harboe, C., et al., *Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging*.  
Carcinogenesis, 2009. **30**(1): 2-10.
- 11 Pascucci, B., Maga, G., Hubscher, U., et al., *Reconstitution of the base excision repair pathway for 7,8-dihydro-8-oxoguanine with purified human proteins*.  
Nucleic Acids Res, 2002. **30**(10): 2124-30.
- 12 Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., et al., *Mechanisms of human DNA repair : an update*.  
Toxicology, 2003. **193**(1-2): 3-34.
- 13 Bruner, S.D., Norman, D.P., and Verdine, G.L., *Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA*.  
Nature, 2000. **403**(6772): 859-66.
- 14 Lindahl, T., *Instability and decay of the primary structure of DNA*.  
Nature, 1993. **362**(6422): 709-15.

- 15 Rieger, R.A., Zaika, E.I., Xie, W., et al., *Proteomic approach to identification of proteins reactive for abasic sites in DNA*.  
Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(5): 858-67.
- 16 Sung, J.S. and Demple, B., *Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA*.  
FEBS J, 2006. **273**(8): 1620-9.
- 17 Parikh, S.S., Mol, C.D., Slupphaug, G., et al., *Base excision repair initiation revealed by crystal structures and binding kinetics of human uracil-DNA glycosylase with DNA*.  
EMBO J, 1998. **17**(17): 5214-26.
- 18 Mullaart, E., Lohman, P.H., Berends, F., et al., *DNA damage metabolism and aging*.  
Mutat Res, 1990. **237**(5-6): 189-210.
- 19 Thornalley, P.J., *Protecting the genome : defence against nucleotide glycation and emerging role of glyoxalase I overexpression in multidrug resistance in cancer chemotherapy*.  
Biochem Soc Trans, 2003. **31**: 1372-7.
- 20 Helene, C. and Charlier, M., *Photosensitized reactions in nucleic acids. Photosensitized formation and splitting of pyrimidine dimers*.  
Biochimie, 1971. **53**(11): 1175-80.
- 21 Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., et al., *Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation*.  
Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(37): 13765-70.
- 22 David-Cordonnier, M.H., Laval, J., and O'Neill, P., *Clustered DNA damage, influence on damage excision by XRS5 nuclear extracts and Escherichia coli Nth and Fpg proteins*.  
J Biol Chem, 2000. **275**(16): 11865-73.
- 23 Douki, T. *Respective contributions of direct and indirect effects to high let heavy ions induced DNA damage*. in *7th Winter Research Conference*. 2006. Les Houches, France.
- 24 Friedberg, E.C., *How nucleotide excision repair protects against cancer*.  
Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): 22-33.
- 25 Verdine, G.L. and Norman, D.P., *Covalent trapping of protein-DNA complexes*.  
Annu Rev Biochem, 2003. **72**: 337-66.
- 26 Li, C., Wang, L.E., and Wei, Q., *DNA repair phenotype and cancer susceptibility--a mini review*.  
Int J Cancer, 2009. **124**(5): 999-1007.
- 27 David, S.S. and Williams, S.D., *Chemistry of Glycosylases and Endonucleases Involved in Base-Excision Repair*.  
Chem Rev, 1998. **98**(3): 1221-1262.
- 28 Chollat-Namy, A., *Nouvelles sondes nucléiques pour la mesure d'activités enzymatiques de réparation des dommages de l'ADN par un test de fluorescence*. Ph.D. thesis, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2006.
- 29 Slupphaug, G., Kavli, B., and Krokan, H.E., *The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage*.  
Mutat Res, 2003. **531**(1-2): 231-51.
- 30 Maki, H. and Sekiguchi, M., *MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis*.  
Nature, 1992. **355**(6357): 273-5.

- 31 Mo, J.Y., Maki, H., and Sekiguchi, M., *Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein : sanitization of nucleotide pool.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): 11021-5.
- 32 Treweek, S.C., Henshaw, T.F., Hausinger, R.P., et al., *Oxidative demethylation by Escherichia coli AlkB directly reverts DNA base damage.* Nature, 2002. **419**(6903): 174-8.
- 33 Sancar, G.B., *Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting.* Mutat Res, 2000. **451**(1-2): 25-37.
- 34 Averbeck, D., *Mechanisms of repair and radiation-induced mutagenesis in higher eukaryotes.* Cancer Radiother, 2000. **4**(5): 335-54.
- 35 Cromie, G.A., Connelly, J.C., and Leach, D.R., *Recombination at double-strand breaks and DNA ends : conserved mechanisms from phage to humans.* Mol Cell, 2001. **8**(6): 1163-74.
- 36 Scully, R. and Puget, N., *BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast cancer.* Biochimie, 2002. **84**(1): 95-102.
- 37 Lobrich, M. and Jeggo, P.A., *Harmonising the response to DSBs : a new string in the ATM bow.* DNA Repair (Amst), 2005. **4**(7): 749-59.
- 38 Zharkov, D.O., Shoham, G., and Grollman, A.P., *Structural characterization of the Fpg family of DNA glycosylases.* DNA Repair (Amst), 2003. **2**(8): 839-62.
- 39 Robertson, A.B., Klungland, A., Rognes, T., et al., *DNA repair in mammalian cells : Base excision repair : the long and short of it.* Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(6): 981-93.
- 40 Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., et al., *Oxidative DNA damage : mechanisms, mutation, and disease.* FASEB J, 2003. **17**(10): 1195-214.
- 41 Frosina, G., *Prophylaxis of oxidative DNA damage by formamidopyrimidine-DNA glycosylase.* Int J Cancer, 2006. **119**(1): 1-7.
- 42 Hegde, M.L., Hazra, T.K., and Mitra, S., *Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells.* Cell Res, 2008. **18**(1): 27-47.
- 43 Frosina, G., *Commentary : DNA base excision repair defects in human pathologies.* Free Radic Res, 2004. **38**(10): 1037-54.
- 44 Lanuszewska, J., Cudak, A., Rzeszowska-Wolny, J., et al., *Detection of damage-recognition proteins from human lymphocytes.* Acta Biochim Pol, 2000. **47**(2): 443-50.
- 45 Boiteux, S., O'Connor, T.R., Lederer, F., et al., *Homogeneous Escherichia coli FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/apyrimidinic sites.* J Biol Chem, 1990. **265**(7): 3916-22.

- 46· Dodson, M.L., Michaels, M.L., and Lloyd, R.S., *Unified catalytic mechanism for DNA glycosylases*.  
J Biol Chem, 1994. **269**(52): 32709-12.
- 47· Hazra, T.K., Das, A., Das, S., et al., *Oxidative DNA damage repair in mammalian cells : a new perspective*.  
DNA Repair (Amst), 2007. **6**(4): 470-80.
- 48· Francis, A.W. and David, S.S., *Escherichia coli MutY and Fpg utilize a processive mechanism for target location*.  
Biochemistry, 2003. **42**(3): 801-10.
- 49· Gilboa, R., Zharkov, D.O., Golan, G., et al., *Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA*.  
J Biol Chem, 2002. **277**(22): 19811-6.
- 50· Miller, J.H., Fan-Chiang, C.C., Straatsma, T.P., et al., *8-Oxoguanine enhances bending of DNA that favors binding to glycosylases*.  
J Am Chem Soc, 2003. **125**(20): 6331-6.
- 51· Kubota, Y., Nash, R.A., Klungland, A., et al., *Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins : interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein*.  
EMBO J, 1996. **15**(23): 6662-70.
- 52· Graves, R.J., Felzenszwalb, I., Laval, J., et al., *Excision of 5'-terminal deoxyribose phosphate from damaged DNA is catalyzed by the Fpg protein of Escherichia coli*.  
J Biol Chem, 1992. **267**(20): 14429-35.
- 53· Fromme, J.C., Banerjee, A., and Verdine, G.L., *DNA glycosylase recognition and catalysis*.  
Curr Opin Struct Biol, 2004. **14**(1): 43-9.
- 54· Simonelli, V., Narciso, L., Dogliotti, E., et al., *Base excision repair intermediates are mutagenic in mammalian cells*.  
Nucleic Acids Res, 2005. **33**(14): 4404-11.
- 55· Cadet, J., Bourdat, A.G., D'Ham, C., et al., *Oxidative base damage to DNA : specificity of base excision repair enzymes*.  
Mutat Res, 2000. **462**(2-3): 121-8.
- 56· Boiteux, S., O'Connor, T.R., and Laval, J., *Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of Escherichia coli : cloning and sequencing of the fpg structural gene and overproduction of the protein*.  
EMBO J, 1987. **6**(10): 3177-83.
- 57· Castaing, B., Geiger, A., Seliger, H., et al., *Cleavage and binding of a DNA fragment containing a single 8-oxoguanine by wild type and mutant FPG proteins*.  
Nucleic Acids Res, 1993. **21**(12): 2899-905.
- 58· O'Connor, T.R., Graves, R.J., de Murcia, G., et al., *Fpg protein of Escherichia coli is a zinc finger protein whose cysteine residues have a structural and/or functional role*.  
J Biol Chem, 1993. **268**(12): 9063-70.
- 59· Ishchenko, A.A., Vasilenko, N.L., Sinitsina, O.I., et al., *Thermodynamic, kinetic, and structural basis for recognition and repair of 8-oxoguanine in DNA by Fpg protein from Escherichia coli*.  
Biochemistry, 2002. **41**(24): 7540-8.

- 60 Koval, V.V., Kuznetsov, N.A., Zharkov, D.O., et al., *Pre-steady-state kinetics shows differences in processing of various DNA lesions by Escherichia coli formamidopyrimidine-DNA glycosylase.* Nucleic Acids Res, 2004. **32**(3): 926-35.
- 61 Gasparutto, D., Bourdat, A.G., D'Ham, C., et al., *Repair and replication of oxidized DNA bases using modified oligodeoxyribonucleotides.* Biochimie, 2000. **82**(1): 19-24.
- 62 Perlow-Poehnelt, R.A., Zharkov, D.O., Grollman, A.P., et al., *Substrate discrimination by formamidopyrimidine-DNA glycosylase : distinguishing interactions within the active site.* Biochemistry, 2004. **43**(51): 16092-105.
- 63 Castaing, B., Fourrey, J.L., Hervouet, N., et al., *AP site structural determinants for Fpg specific recognition.* Nucleic Acids Res, 1999. **27**(2): 608-15.
- 64 Castaing, B., Boiteux, S., and Zelwer, C., *DNA containing a chemically reduced apurinic site is a high affinity ligand for the E. coli formamidopyrimidine-DNA glycosylase.* Nucleic Acids Res, 1992. **20**(3): 389-94.
- 65 Tchou, J., Bodepudi, V., Shibutani, S., et al., *Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA.* J Biol Chem, 1994. **269**(21): 15318-24.
- 66 Rogacheva, M., Ishchenko, A., Saparbaev, M., et al., *High resolution characterization of formamidopyrimidine-DNA glycosylase interaction with its substrate by chemical cross-linking and mass spectrometry using substrate analogs.* J Biol Chem, 2006. **281**(43): 32353-65.
- 67 Cunningham, R.P. and Weiss, B., *Endonuclease III (nth) mutants of Escherichia coli.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(2): 474-78.
- 68 Dizdaroglu, M., Laval, J., and Boiteux, S., *Substrate specificity of the Escherichia coli endonuclease III : excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals.* Biochemistry, 1993. **32**(45): 12105-11.
- 69 Pouget, J.-P., *Effet du rayonnement ionisant sur l'ADN cellulaire : mesure des bases puriques et pyrimidiques modifiées.* Ph.D. thesis, Université Paris XI, Paris, 2000.
- 70 Greenberg, M.M., Weledji, Y.N., Kim, J., et al., *Repair of oxidized abasic sites by exonuclease III, endonuclease IV, and endonuclease III.* Biochemistry, 2004. **43**(25): 8178-83.
- 71 Back, J.H., Chung, J.H., Park, Y.I., et al., *Endonuclease IV enhances base excision repair of endonuclease III from Methanobacterium thermoautotrophicum.* DNA Repair (Amst), 2003. **2**(5): 455-70.
- 72 Paz-Elizur, T., Sevilya, Z., Leitner-Dagan, Y., et al., *DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis : potential application for cancer risk assessment and prevention.* Cancer Lett, 2008. **266**(1): 60-72.
- 73 Hazra, T.K., Izumi, T., Maitt, L., et al., *The presence of two distinct 8-oxoguanine repair enzymes in human cells: their potential complementary roles in preventing mutation.* Nucleic Acids Res, 1998. **26**(22): 5116-22.
- 74 Banerjee, A., Yang, W., Karplus, M., et al., *Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA.* Nature, 2005. **434**(7033): 612-8.

- 75 Hegde, V., Wang, M., and Deutsch, W.A., *Human ribosomal protein S3 interacts with DNA base excision repair proteins hAPE/Ref-1 and hOGG1*. *Biochemistry*, 2004. **43**(44): 14211-7.
- 76 D'Errico, M., Parlanti, E., and Dogliotti, E., *Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology*. *Mutat Res*, 2008. **659**(1-2): 4-14.
- 77 Morland, I., Luna, L., Gustad, E., et al., *Product inhibition and magnesium modulate the dual reaction mode of hOgg1*. *DNA Repair (Amst)*, 2005. **4**(3): 381-7.
- 78 Hill, J.W., Hazra, T.K., Izumi, T., et al., *Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease : potential coordination of the initial steps in base excision repair*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(2): 430-8.
- 79 Vidal, A.E., Hickson, I.D., Boiteux, S., et al., *Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease : bypass of the AP lyase activity step*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(6): 1285-92.
- 80 Hirano, T., *Repair system of 7, 8-dihydro-8-oxoguanine as a defense line against carcinogenesis*. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2008. **49**(4): 329-40.
- 81 Krokan, H.E., Nilsen, H., Skorpen, F., et al., *Base excision repair of DNA in mammalian cells*. *FEBS Lett*, 2000. **476**(1-2): 73-7.
- 82 Dianova, II, Bohr, V.A., and Dianov, G.L., *Interaction of human AP endonuclease 1 with flap endonuclease 1 and proliferating cell nuclear antigen involved in long-patch base excision repair*. *Biochemistry*, 2001. **40**(42): 12639-44.
- 83 Masuda, Y., Bennett, R.A., and Demple, B., *Rapid dissociation of human apurinic endonuclease (Ape1) from incised DNA induced by magnesium*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(46): 30360-5.
- 84 Flaherty, D.M., Monick, M.M., and Hunninghake, G.W., *AP endonucleases and the many functions of Ref-1*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. **25**(6): 664-7.
- 85 Brooks, P.J., Wise, D.S., Berry, D.A., et al., *The oxidative DNA lesion 8,5'-(S)-cyclo-2'-deoxyadenosine is repaired by the nucleotide excision repair pathway and blocks gene expression in mammalian cells*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(29): 22355-62.
- 86 Costa, R.M., Chigancas, V., Galhardo Rda, S., et al., *The eukaryotic nucleotide excision repair pathway*. *Biochimie*, 2003. **85**(11): 1083-99.
- 87 Millau, J., *Test fonctionnel de mesure des activités enzymatiques de réparation de l'ADN par excision resynthèse sur support miniaturisé : mise au point et applications*. Ph.D. thesis, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2006.
- 88 Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., et al., *Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair*. *Mol Cell*, 1998. **2**(2): 223-32.

- 89 Raptic-Otrin, V., McLenigan, M.P., Bisi, D.C., et al., *Sequential binding of UV DNA damage binding factor and degradation of the p48 subunit as early events after UV irradiation.* Nucleic Acids Res, 2002. **30**(11): 2588-98.
- 90 Tang, J. and Chu, G., *Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein.* DNA Repair (Amst), 2002. **1**(8): 601-16.
- 91 Villani, G. and Tanguy Le Gac, N., *Interactions of DNA helicases with damaged DNA : possible biological consequences.* J Biol Chem, 2000. **275**(43): 33185-8.
- 92 Salsbury, F.R., Jr., Clodfelter, J.E., Gentry, M.B., et al., *The molecular mechanism of DNA damage recognition by MutS homologs and its consequences for cell death response.* Nucleic Acids Res, 2006. **34**(8): 2173-85.
- 93 Gerard, A., Polo, S.E., Roche, D., et al., *Methods for studying chromatin assembly coupled to DNA repair.* Methods Enzymol, 2006. **409**: 358-74.
- 94 Goodhead, D.T., *The initial physical damage produced by ionizing radiations.* Int J Radiat Biol, 1989. **56**(5): 623-34.
- 95 Harrison, L., Hatahet, Z., and Wallace, S.S., *In vitro repair of synthetic ionizing radiation-induced multiply damaged DNA sites.* J Mol Biol, 1999. **290**(3): 667-84.
- 96 Sutherland, B.M., Bennett, P.V., Sidorkina, O., et al., *Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): 103-8.
- 97 Lomax, M.E., Cunniffe, S., and O'Neill, P., *Efficiency of repair of an abasic site within DNA clustered damage sites by mammalian cell nuclear extracts.* Biochemistry, 2004. **43**(34): 11017-26.
- 98 Malyarchuk, S., Castore, R., and Harrison, L., *Apex1 can cleave complex clustered DNA lesions in cells.* DNA Repair (Amst), 2009. **8**(12): 1343-54.
- 99 Pearson, C.G., Shikazono, N., Thacker, J., et al., *Enhanced mutagenic potential of 8-oxo-7,8-dihydroguanine when present within a clustered DNA damage site.* Nucleic Acids Res, 2004. **32**(1): 263-70.
- 100 David-Cordonnier, M.H., Boiteux, S., and O'Neill, P., *Efficiency of excision of 8-oxo-guanine within DNA clustered damage by XRS5 nuclear extracts and purified human OGG1 protein.* Biochemistry, 2001. **40**(39): 11811-8.
- 101 Eot-Houllier, G., Gonera, M., Gasparutto, D., et al., *Interplay between DNA N-glycosylases/AP lyases at multiply damaged sites and biological consequences.* Nucleic Acids Res, 2007. **35**(10): 3355-66.
- 102 D'Souza D, I. and Harrison, L., *Repair of clustered uracil DNA damages in Escherichia coli.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(15): 4573-81.
- 103 David-Cordonnier, M.H., Laval, J., and O'Neill, P., *Recognition and kinetics for excision of a base lesion within clustered DNA damage by the Escherichia coli proteins Fpg and Nth.* Biochemistry, 2001. **40**(19): 5738-46.



- 104 Barone, F., Dogliotti, E., Cellai, L., et al., *Influence of DNA torsional rigidity on excision of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in the presence of opposing abasic sites by human OGG1 protein.*  
Nucleic Acids Res, 2003. **31**(7): 1897-903.
- 105 David-Cordonnier, M.H., Cunniffe, S.M., Hickson, I.D., et al., *Efficiency of incision of an AP site within clustered DNA damage by the major human AP endonuclease.*  
Biochemistry, 2002. **41**(2): 634-42.
- 106 Byrne, S., Cunniffe, S., O'Neill, P., et al., *5,6-Dihydrothymine impairs the base excision repair pathway of a closely opposed AP site or single-strand break.*  
Radiat Res, 2009. **172**(5): 537-49.
- 107 Lomax, M.E., Salje, H., Cunniffe, S., et al., *8-OxoA inhibits the incision of an AP site by the DNA glycosylases Fpg, Nth and the AP endonuclease HAP1.*  
Radiat Res, 2005. **163**(1): 79-84.
- 108 Cunniffe, S.M., Lomax, M.E., and O'Neill, P., *An AP site can protect against the mutagenic potential of 8-oxoG when present within a tandem clustered site in E. coli.*  
DNA Repair (Amst), 2007. **6**(12): 1839-49.
- 109 Ali, M.M., Hazra, T.K., Hong, D., et al., *Action of human endonucleases III and VIII upon DNA-containing tandem dihydrouracil.*  
DNA Repair (Amst), 2005. **4**(6): 679-86.
- 110 Eccles, L.J., Lomax, M.E., and O'Neill, P., *Hierarchy of lesion processing governs the repair, double-strand break formation and mutability of three-lesion clustered DNA damage.*  
Nucleic Acids Res, 2010. **38**(4): 1123-34.
- 111 Yang, J., Yu, Y., Hamrick, H.E., et al., *ATM, ATR and DNA-PK : initiators of the cellular genotoxic stress responses.*  
Carcinogenesis, 2003. **24**(10): 1571-80.
- 112 Garber, P.M., Vidanes, G.M., and Toczyski, D.P., *Damage in transition.*  
Trends Biochem Sci, 2005. **30**(2): 63-6.
- 113 Bishay, K., Ory, K., Olivier, M.F., et al., *DNA damage-related RNA expression to assess individual sensitivity to ionizing radiation.*  
Carcinogenesis, 2001. **22**(8): 1179-83.
- 114 Harfouche, G., Rachidi, W., Vaigot, P., et al., *FGF2 signaling is critical for DNA repair in human keratinocyte stem cells.*  
Stem Cell, Sous presse.
- 115 Sesto, A., Navarro, M., Burslem, F., et al., *Analysis of the ultraviolet B response in primary human keratinocytes using oligonucleotide microarrays.*  
Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): 2965-70.
- 116 Mammone, T., Ingrassia, M., Gan, D., et al., *The cytoprotective effects of exogenous DNA fragments.*  
Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2002. **15**(1): 26-34.
- 117 Sakamoto-Hojo, E.T., Mello, S.S., Pereira, E., et al., *Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress.*  
Mutat Res, 2003. **544**(2-3): 403-13.
- 118 Hazane, F., Valenti, K., Sauvaigo, S., et al., *Ageing effects on the expression of cell defence genes after UVA irradiation in human male cutaneous fibroblasts using cDNA arrays.*  
J Photochem Photobiol B, 2005. **79**(3): 171-90.

- 119 Chaudhry, M.A., *Base excision repair of ionizing radiation-induced DNA damage in G1 and G2 cell cycle phases.*  
Cancer Cell Int, 2007. **7**: 1-11.
- 120 Liu, W., Nichols, A.F., Graham, J.A., et al., *Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light.*  
J Biol Chem, 2000. **275**(28): 21429-34.
- 121 Kamiuchi, S., Saijo, M., Citterio, E., et al., *Translocation of Cockayne syndrome group A protein to the nuclear matrix : possible relevance to transcription-coupled DNA repair.*  
Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): 201-6.
- 122 Christmann, M. and Kaina, B., *Nuclear translocation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 as a response of cells to alkylating agents.*  
J Biol Chem, 2000. **275**(46): 36256-62.
- 123 Wu, K.K., *Analysis of protein-DNA binding by streptavidin-agarose pulldown.*  
Methods Mol Biol, 2006. **338**: 281-90.
- 124 Campalans, A., Amouroux, R., Bravard, A., et al., *UVA irradiation induces relocalisation of the DNA repair protein hOGG1 to nuclear speckles.*  
J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 1): 23-32.
- 125 Kang, T.H., Reardon, J.T., Kemp, M., et al., *Circadian oscillation of nucleotide excision repair in mammalian brain.*  
Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(8): 2864-7.
- 126 Lu, T., Pan, Y., Kao, S.Y., et al., *Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain.*  
Nature, 2004. **429**(6994): 883-91.
- 127 Szczesny, B., Bhakat, K.K., Mitra, S., et al., *Age-dependent modulation of DNA repair enzymes by covalent modification and subcellular distribution.*  
Mech Ageing Dev, 2004. **125**(10-11): 755-65.
- 128 Imam, S.Z., Karahalil, B., Hogue, B.A., et al., *Mitochondrial and nuclear DNA-repair capacity of various brain regions in mouse is altered in an age-dependent manner.*  
Neurobiol Aging, 2006. **27**(8): 1129-36.
- 129 Beckman, K.B. and Ames, B.N., *Oxidative decay of DNA.*  
J Biol Chem, 1997. **272**(32): 19633-6.
- 130 McBride, T.J., Preston, B.D., and Loeb, L.A., *Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals.*  
Biochemistry, 1991. **30**(1): 207-13.
- 131 Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., et al., *8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions.*  
J Biol Chem, 1992. **267**(1): 166-72.
- 132 Wood, M.L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E., et al., *Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis : genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome.*  
Biochemistry, 1990. **29**(30): 7024-32.
- 133 Chevillard, S., Radicella, J.P., Levalois, C., et al., *Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours.*  
Oncogene, 1998. **16**(23): 3083-6.

- 134· Xu, X., Stower, M.J., Reid, I.N., et al., *A hot spot for p53 mutation in transitional cell carcinoma of the bladder : clues to the etiology of bladder cancer.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1997. **6**(8): 611-6.
- 135· Lowndes, N.F. and Murguia, J.R., *Sensing and responding to DNA damage.* Curr Opin Genet Dev, 2000. **10**(1): 17-25.
- 136· Adimoolam, S., Lin, C.X., and Ford, J.M., *The p53-regulated cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 (cip1, waf1, sdi1), is not required for global genomic and transcription-coupled nucleotide excision repair of UV-induced DNA photoproducts.* J Biol Chem, 2001. **276**(28): 25813-22.
- 137· Wakasugi, M., Kawashima, A., Morioka, H., et al., *DDB accumulates at DNA damage sites immediately after UV irradiation and directly stimulates nucleotide excision repair.* J Biol Chem, 2002. **277**(3): 1637-40.
- 138· Shen, J., Gilmore, E.C., Marshall, C.A., et al., *Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair.* Nat Genet, 2010. **42**(3): 245-9.
- 139· Fuss, J.O. and Cooper, P.K., *DNA repair : dynamic defenders against cancer and aging.* PLoS Biol, 2006. **4**(6): e203.
- 140· Ames, B.N. and Saul, R.L. (1988). *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part A : Basic Principles and Mechanisms of Action.* New York: Alan R. Liss.
- 141· Adelman, R., Saul, R.L., and Ames, B.N., *Oxidative damage to DNA : relation to species metabolic rate and life span.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(8): 2706-8.
- 142· Collins, A.R., Gedik, C.M., Olmedilla, B., et al., *Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes : large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates.* FASEB J, 1998. **12**(13): 1397-400.
- 143· Le Marchand, L., Donlon, T., Lum-Jones, A., et al., *Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002. **11**(4): 409-12.
- 144· Jeon, H.S., Kim, K.M., Park, S.H., et al., *Relationship between XPG codon 1104 polymorphism and risk of primary lung cancer.* Carcinogenesis, 2003. **24**(10): 1677-81.
- 145· Gao, W.M., Romkes, M., Day, R.D., et al., *Association of the DNA repair gene XPD Asp312Asn polymorphism with p53 gene mutations in tobacco-related non-small cell lung cancer.* Carcinogenesis, 2003. **24**(10): 1671-6.
- 146· van Gils, C.H., Bostick, R.M., Stern, M.C., et al., *Differences in base excision repair capacity may modulate the effect of dietary antioxidant intake on prostate cancer risk : an example of polymorphisms in the XRCC1 gene.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2002. **11**(11): 1279-84.
- 147· Wang, Z.H., Miao, X.P., Tan, W., et al., *Single nucleotide polymorphisms in XRCC1 and clinical response to platin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer.* Ai Zheng, 2004. **23**(8): 865-8.
- 148· Jacob, S. and Praz, F., *DNA mismatch repair defects : role in colorectal carcinogenesis.* Biochimie, 2002. **84**(1): 27-47.

- 149 Achanta, G. and Huang, P., *Role of p53 in sensing oxidative DNA damage in response to reactive oxygen species-generating agents.* Cancer Res, 2004. **64**(17): 6233-9.
- 150 Fishel, M.L. and Kelley, M.R., *The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target.* Mol Aspects Med, 2007. **28**(3-4): 375-95.
- 151 Yamayoshi, Y., Iida, E., and Tanigawara, Y., *Cancer pharmacogenomics : international trends.* Int J Clin Oncol, 2005. **10**(1): 5-13.
- 152 Herring, C.J., West, C.M., Wilks, D.P., et al., *Levels of the DNA repair enzyme human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1, APEX, Ref-1) are associated with the intrinsic radiosensitivity of cervical cancers.* Br J Cancer, 1998. **78**(9): 1128-33.
- 153 Riedl, T., Hanaoka, F., and Egly, J.M., *The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA.* EMBO J, 2003. **22**(19): 5293-303.
- 154 Rosell, R., Lord, R.V., Taron, M., et al., *DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer.* Lung Cancer, 2002. **38**(3): 217-27.
- 155 Lord, R.V., Brabender, J., Gandara, D., et al., *Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer.* Clin Cancer Res, 2002. **8**(7): 2286-91.
- 156 Toussaint, O., Medrano, E.E., and von Zglinicki, T., *Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes.* Exp Gerontol, 2000. **35**(8): 927-45.
- 157 Dirksen, E.H., Pinkse, M.W., Rijkers, D.T., et al., *Investigating the dynamic nature of the interactions between nuclear proteins and histones upon DNA damage using an immobilized peptide chemical proteomics approach.* J Proteome Res, 2006. **5**(9): 2380-8.
- 158 Liao, W., McNutt, M.A., and Zhu, W.G., *The comet assay : a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells.* Methods, 2009. **48**(1): 46-53.
- 159 Cadet, J., Douki, T., and Ravanat, J.L., *Oxidatively generated base damage to cellular DNA.* Free Radic Biol Med, 2010.
- 160 Kow, Y.W. and Dare, A., *Detection of abasic sites and oxidative DNA base damage using an ELISA-like assay.* Methods, 2000. **22**(2): 164-9.
- 161 Mohsin Ali, M., Kurisu, S., Yoshioka, Y., et al., *Detection of endonuclease III- and 8-oxoguanine glycosylase-sensitive base modifications in gamma-irradiated DNA and cells by the aldehyde reactive probe (ARP) assay.* J Radiat Res (Tokyo), 2004. **45**(2): 229-37.
- 162 Guillonneau, F., Guieysse, A.L., Le Caer, J.P., et al., *Selection and identification of proteins bound to DNA triple-helical structures by combination of 2D-electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry.* Nucleic Acids Res, 2001. **29**(11): 2427-36.

- 163 Oda, M. and Nakamura, H., *Thermodynamic and kinetic analyses for understanding sequence-specific DNA recognition*.  
Genes Cells, 2000. **5**(5): 319-26.
- 164 Doyon, J.B., Snyder, T.M., and Liu, D.R., *Highly sensitive in vitro selections for DNA-linked synthetic small molecules with protein binding affinity and specificity*.  
J Am Chem Soc, 2003. **125**(41): 12372-3.
- 165 Yaneva, M. and Tempst, P., *Affinity capture of specific DNA-binding proteins for mass spectrometric identification*.  
Anal Chem, 2003. **75**(23): 6437-48.
- 166 Bischoff, S.R., Kahn, M.B., Powell, M.D., et al., *SELDI-TOF-MS analysis of transcriptional activation protein binding to response elements regulating carcinogenesis enzymes*.  
Int. J. Mol. Sci, 2002. **3**: 1027-1038.
- 167 Luscombe, N.M., Austin, S.E., Berman, H.M., et al., *An overview of the structures of protein-DNA complexes*.  
Genome Biol, 2000. **1**(1): 1-37.
- 168 Nocentini, S., Coin, F., Saijo, M., et al., *DNA damage recognition by XPA protein promotes efficient recruitment of transcription factor II H*.  
J Biol Chem, 1997. **272**(37): 22991-4.
- 169 Garner, M.M. and Revzin, A., *A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions : application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system*.  
Nucleic Acids Res, 1981. **9**(13): 3047-60.
- 170 Laniel, M.A., Beliveau, A., and Guerin, S.L., *Electrophoretic mobility shift assays for the analysis of DNA-protein interactions*.  
Methods Mol Biol, 2001. **148**: 13-30.
- 171 Larouche, K., Bergeron, M.J., Leclerc, S., et al., *Optimization of competitor poly(dI-dC).poly(dI-dC) levels is advised in DNA-protein interaction studies involving enriched nuclear proteins*.  
Biotechniques, 1996. **20**(3): 439-44.
- 172 Guille, M.J. and Kneale, G.G., *Methods for the analysis of DNA-protein interactions*.  
Mol Biotechnol, 1997. **8**(1): 35-52.
- 173 Muller, E., *Synthèse d'oligonucléotides modifiés pour l'étude de la réparation et de la réplication de lésions radio-induites simples et doubles de l'ADN*. Ph.D. thesis, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2002.
- 174 Duarte, V., Gasparutto, D., Jaquinod, M., et al., *Repair and mutagenic potential of oxaluric acid, a major product of singlet oxygen-mediated oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine*.  
Chem Res Toxicol, 2001. **14**(1): 46-53.
- 175 Ge, H., *UPA, a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein-DNA, protein-RNA and protein-ligand interactions*.  
Nucleic Acids Res, 2000. **28**(2): e3.
- 176 Templin, M.F., Stoll, D., Schrenk, M., et al., *Protein microarray technology*.  
Trends Biotechnol, 2002. **20**(4): 160-6.
- 177 Lee, H.J., Yan, Y., Marriott, G., et al., *Quantitative functional analysis of protein complexes on surfaces*.  
J Physiol, 2005. **563**: 61-71.

- 178 Sauvaigo, S., Guerniou, V., Rapin, D., et al., *An oligonucleotide microarray for the monitoring of repair enzyme activity toward different DNA base damage.*  
Anal Biochem, 2004. **333**(1): 182-92.
- 179 Schubert, F., Zettl, H., Hafner, W., et al., *Comparative thermodynamic analysis of DNA--protein interactions using surface plasmon resonance and fluorescence correlation spectroscopy.*  
Biochemistry, 2003. **42**(34): 10288-94.
- 180 Dragan, A.I. and Privalov, P.L., *Use of fluorescence resonance energy transfer (FRET) in studying protein-induced DNA bending.*  
Methods Enzymol, 2008. **450**: 185-99.
- 181 Madhusudan, S., Smart, F., Shrimpton, P., et al., *Isolation of a small molecule inhibitor of DNA base excision repair.*  
Nucleic Acids Res, 2005. **33**(15): 4711-24.
- 182 Sadakane, Y. and Hatanaka, Y., *Photochemical fishing approaches for identifying target proteins and elucidating the structure of a ligand-binding region using carbene-generating photoreactive probes.*  
Anal Sci, 2006. **22**(2): 209-18.
- 183 Cooke, M.S. and Robson, A., *Immunochemical detection of UV-induced DNA damage and repair.*  
Methods Mol Biol, 2006. **314**: 215-28.
- 184 Wang, J. and Liu, J., *Directly fishing out subtle mutations in genomic DNA with histidine-tagged Thermus thermophilus MutS.*  
Mutat Res, 2004. **547**(1-2): 41-7.
- 185 Darain, F., Ban, C., and Shim, Y.B., *Development of a new and simple method for the detection of histidine-tagged proteins.*  
Biosens Bioelectron, 2004. **20**(4): 857-63.
- 186 Ho, C.K., Lam, A.F., and Symington, L.S., *Identification of nucleases and phosphatases by direct biochemical screen of the Saccharomyces cerevisiae proteome.*  
PLoS One, 2009. **4**(9): e6993.
- 187 Xia, L. and O'Connor, T.R., *DNA glycosylase activity assay based on streptavidin paramagnetic bead substrate capture.*  
Anal Biochem, 2001. **298**(2): 322-6.
- 188 Bulyk, M.L., Gentalen, E., Lockhart, D.J., et al., *Quantifying DNA-protein interactions by double-stranded DNA arrays.*  
Nat Biotechnol, 1999. **17**(6): 573-7.
- 189 Visser, N.F., Scholten, A., van den Heuvel, R.H., et al., *Surface-plasmon-resonance-based chemical proteomics : efficient specific extraction and semiquantitative identification of cyclic nucleotide-binding proteins from cellular lysates by using a combination of surface plasmon resonance, sequential elution and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.*  
Chembiochem, 2007. **8**(3): 298-305.
- 190 Catimel, B., Rothacker, J., Catimel, J., et al., *Biosensor-based micro-affinity purification for the proteomic analysis of protein complexes.*  
J Proteome Res, 2005. **4**(5): 1646-56.
- 191 Yaneva, M. and Tempst, P., *Isolation and mass spectrometry of specific DNA binding proteins.*  
Methods Mol Biol, 2006. **338**: 291-303.

- 192 Mello, J.A., Moggs, J.G., and Almouzni, G., *Analysis of DNA repair and chromatin assembly in vitro using immobilized damaged DNA substrates.*  
Methods Mol Biol, 2006. **314**: 477-87.
- 193 Hagarat, N., Cardoso, G.M., Rusconi, F., et al., *Analytical biochemistry of DNA--protein assemblies from crude cell extracts.*  
Nucleic Acids Res, 2007. **35**(13): e92.
- 194 Barker, S., Murray, D., Zheng, J., et al., *A method for the isolation of covalent DNA-protein crosslinks suitable for proteomics analysis.*  
Anal Biochem, 2005. **344**(2): 204-15.
- 195 Voss, T. and Haberl, P., *Observations on the reproducibility and matching efficiency of two-dimensional electrophoresis gels : consequences for comprehensive data analysis.*  
Electrophoresis, 2000. **21**(16): 3345-50.
- 196 Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., et al., *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.*  
Electrophoresis, 2000. **21**(6): 1037-53.
- 197 Harry, J.L., Wilkins, M.R., Herbert, B.R., et al., *Proteomics : capacity versus utility.*  
Electrophoresis, 2000. **21**(6): 1071-81.
- 198 Leimgruber, R.M., Malone, J.P., Radabaugh, M.R., et al., *Development of improved cell lysis, solubilization and imaging approaches for proteomic analyses.*  
Proteomics, 2002. **2**(2): 135-44.
- 199 Shaw, M.M. and Riederer, B.M., *Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis.*  
Proteomics, 2003. **3**(8): 1408-17.
- 200 Mann, M., Hendrickson, R.C., and Pandey, A., *Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry.*  
Annu Rev Biochem, 2001. **70**: 437-73.
- 201 Corthals, G.L., Wasinger, V.C., Hochstrasser, D.F., et al., *The dynamic range of protein expression : a challenge for proteomic research.*  
Electrophoresis, 2000. **21**(6): 1104-15.
- 202 Wulfkuhle, J.D., Liotta, L.A., and Petricoin, E.F., *Proteomic applications for the early detection of cancer.*  
Nat Rev Cancer, 2003. **3**(4): 267-75.
- 203 Bane, T.K., LeBlanc, J.F., Lee, T.D., et al., *DNA affinity capture and protein profiling by SELDI-TOF mass spectrometry : effect of DNA methylation.*  
Nucleic Acids Res, 2002. **30**(14): e69.
- 204 Lee, W.C. and Lee, K.H., *Applications of affinity chromatography in proteomics.*  
Anal Biochem, 2004. **324**(1): 1-10.
- 205 Yip, T.T. and Lomas, L., *SELDI ProteinChip array in oncoproteomic research.*  
Technol Cancer Res Treat, 2002. **1**(4): 273-80.
- 206 von Eggeling, F., Junker, K., Fiedle, W., et al., *Mass spectrometry meets chip technology : a new proteomic tool in cancer research?*  
Electrophoresis, 2001. **22**(14): 2898-902.
- 207 Srinivas, P.R., Srivastava, S., Hanash, S., et al., *Proteomics in early detection of cancer.*  
Clin Chem, 2001. **47**(10): 1901-11.

- 208 Forde, C.E. and McCutchen-Maloney, S.L., *Characterization of transcription factors by mass spectrometry and the role of SELDI-MS*. Mass Spectrom Rev, 2002. **21**(6): 419-39.
- 209 Majka, J. and Speck, C., *Analysis of protein-DNA interactions using surface plasmon resonance*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2007. **104**: 13-36.
- 210 Koval, V.V., Kuznetsov, N.A., Ishchenko, A.A., et al., *Real-time studies of conformational dynamics of the repair enzyme E. coli formamidopyrimidine-DNA glycosylase and its DNA complexes during catalytic cycle*. Mutat Res, 2010. **685**(1-2): 3-10.
- 211 Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., et al. (2004). *Essential Cell Biology* Oxford: Garland Publishing Inc.
- 212 Bondeson, K., Frostell-Karlsson, A., Fagerstam, L., et al., *Lactose repressor-operator DNA interactions : kinetic analysis by a surface plasmon resonance biosensor*. Anal Biochem, 1993. **214**(1): 245-51.
- 213 Saparbaev, M., Mani, J.C., and Laval, J., *Interactions of the human, rat, Saccharomyces cerevisiae and Escherichia coli 3-methyladenine-DNA glycosylases with DNA containing dIMP residues*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(6): 1332-9.
- 214 Maillart, E., Brengel-Pesce, K., Capela, D., et al., *Versatile analysis of multiple macromolecular interactions by SPR imaging : application to p53 and DNA interaction*. Oncogene, 2004. **23**(32): 5543-50.
- 215 Chen, J.Q., Eshete, M., Alworth, W.L., et al., *Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements*. J Cell Biochem, 2004. **93**(2): 358-73.
- 216 Nordhoff, E. and Lehrach, H., *Identification and characterization of DNA-binding proteins by mass spectrometry*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2007. **104**: 111-95.
- 217 Srinivas, P.R., Verma, M., Zhao, Y., et al., *Proteomics for cancer biomarker discovery*. Clin Chem, 2002. **48**(8): 1160-9.
- 218 Becker, J.S. and Jakubowski, N., *The synergy of elemental and biomolecular mass spectrometry : new analytical strategies in life sciences*. Chem Soc Rev, 2009. **38**(7): 1969-83.
- 219 Patterson, S.D. and Aebersold, R.H., *Proteomics : the first decade and beyond*. Nat Genet, 2003. **33 Suppl**: 311-23.
- 220 Himeda, C.L., Ranish, J.A., and Hauschka, S.D., *Quantitative proteomic identification of MAZ as a transcriptional regulator of muscle-specific genes in skeletal and cardiac myocytes*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(20): 6521-35.
- 221 Chapman, K., *The ProteinChip Biomarker System from Ciphergen Biosystems : a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(2): 82-7.
- 222 Pusch, W., Flocco, M.T., Leung, S.M., et al., *Mass spectrometry-based clinical proteomics*. Pharmacogenomics, 2003. **4**(4): 463-76.



- 223· Bouffartigues, E., Leh, H., Anger-Leroy, M., et al., *Rapid coupling of Surface Plasmon Resonance (SPR and SPRI) and ProteinChip based mass spectrometry for the identification of proteins in nucleoprotein interactions.*  
Nucleic Acids Res, 2007. **35**(6): e39.
- 224· Font, M.P., Cubizolles, M., Dombret, H., et al., *Repression of transcription at the human T-cell receptor Vbeta2.2 segment is mediated by a MAX/MAD/mSin3 complex acting as a scaffold for HDAC activity.*  
Biochem Biophys Res Commun, 2004. **325**(3): 1021-9.
- 225· Krone, J.R., Nelson, R.W., Dogruel, D., et al., *BIA/MS : interfacing biomolecular interaction analysis with mass spectrometry.*  
Anal Biochem, 1997. **244**(1): 124-32.
- 226· Nelson, R.W., Krone, J.R., and Jansson, O., *Surface plasmon resonance biomolecular interaction analysis mass spectrometry. 2. Fiber optic-based analysis.*  
Anal Chem, 1997. **69**(21): 4369-74.
- 227· Lopez, F., Pichereaux, C., Burlet-Schiltz, O., et al., *Improved sensitivity of biomolecular interaction analysis mass spectrometry for the identification of interacting molecules.*  
Proteomics, 2003. **3**(4): 402-12.
- 228· Nedelkov, D. and Nelson, R.W., *Surface plasmon resonance mass spectrometry : recent progress and outlooks.*  
Trends Biotechnol, 2003. **21**(7): 301-5.
- 229· Nedelkov, D. and Nelson, R.W., *Analysis of native proteins from biological fluids by biomolecular interaction analysis mass spectrometry (BIA/MS) : exploring the limit of detection, identification of non-specific binding and detection of multi-protein complexes.*  
Biosens Bioelectron, 2001. **16**(9-12): 1071-8.
- 230· Nelson, R.W., Nedelkov, D., and Tubbs, K.A., *Biosensor chip mass spectrometry : a chip-based proteomics approach.*  
Electrophoresis, 2000. **21**(6): 1155-63.
- 231· Nedelkov, D., Tubbs, K.A., and Nelson, R.W., *Surface plasmon resonance-enabled mass spectrometry arrays.*  
Electrophoresis, 2006. **27**(18): 3671-5.
- 232· Natsume, T., Nakayama, H., and Isobe, T., *BIA-MS-MS : biomolecular interaction analysis for functional proteomics.*  
Trends Biotechnol, 2001. **19**(10 Suppl): S28-33.
- 233· Scarano, S., Mascini, M., Turner, A.P., et al., *Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors.*  
Biosens Bioelectron, 2010. **25**(5): 957-66.
- 234· Hayashi, G., Hagihara, M., and Nakatani, K., *Genotyping by allele-specific L-DNA-tagged PCR.*  
J Biotechnol, 2008. **135**(2): 157-60.
- 235· Li, Y., Lee, H.J., and Corn, R.M., *Fabrication and characterization of RNA aptamer microarrays for the study of protein-aptamer interactions with SPR imaging.*  
Nucleic Acids Res, 2006. **34**(22): 6416-24.
- 236· Jeong, E.J., Jeong, Y.S., Park, K., et al., *Directed immobilization of DNA-binding proteins on a cognate DNA-modified chip surface.*  
J Biotechnol, 2008. **135**(1): 16-21.

- 237 Garcia II, B.H. and Goodman, R.M., *Use of surface plasmon resonance imaging to study viral RNA : protein interactions.*  
J Virol Methods, 2008. **147**(1): 18-25.
- 238 Ladd, J., Taylor, A.D., Piliarik, M., et al., *Label-free detection of cancer biomarker candidates using surface plasmon resonance imaging.*  
Anal Bioanal Chem, 2009. **393**(4): 1157-63.
- 239 Grant, C.F., Kanda, V., Yu, H., et al., *Optimization of immobilized bacterial disaccharides for surface plasmon resonance imaging measurements of antibody binding.*  
Langmuir, 2008. **24**(24): 14125-32.
- 240 Schasfoort, R.B.M. (2008). *Handbook of Surface Plasmon Resonance* Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- 241 Fiche, J., *Etudes thermiques des puces à ADN par imagerie de résonance des plasmons de surface (SPRi) : vers la détection de mutations ponctuelles.* Ph.D. thesis, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2006.
- 242 Tanious, F.A., Nguyen, B., and Wilson, W.D., *Biosensor-surface plasmon resonance methods for quantitative analysis of biomolecular interactions.*  
Methods Cell Biol, 2008. **84**: 53-77.
- 243 Livache, T., Roget, A., Dejean, E., et al., *Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group.*  
Nucleic Acids Res, 1994. **22**(15): 2915-21.
- 244 Bidan, G., Billon, M., Galasso, K., et al., *Electropolymerization as a versatile route for immobilizing biological species onto surfaces. Application to DNA biochips.*  
Appl Biochem Biotechnol, 2000. **89**(2-3): 183-93.
- 245 Grosjean, L., Cherif, B., Mercey, E., et al., *A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process.*  
Anal Biochem, 2005. **347**(2): 193-200.
- 246 Mercey, E., Sadir, R., Maillart, E., et al., *Polypyrrole oligosaccharide array and surface plasmon resonance imaging for the measurement of glycosaminoglycan binding interactions.*  
Anal Chem, 2008. **80**(9): 3476-82.
- 247 Bryan, D., Aylwin, S.J., Newman, D.J., et al., *Steroidogenic factor 1-DNA binding : a kinetic analysis using surface plasmon resonance.*  
J Mol Endocrinol, 1999. **22**(3): 241-9.
- 248 Webster, C.I., Cooper, M.A., Packman, L.C., et al., *Kinetic analysis of high-mobility-group proteins HMG-1 and HMG-I/Y binding to cholesterol-tagged DNA on a supported lipid monolayer.*  
Nucleic Acids Res, 2000. **28**(7): 1618-24.
- 249 Pacek, M., Konopa, G., and Konieczny, I., *DnaA box sequences as the site for helicase delivery during plasmid RK2 replication initiation in Escherichia coli.*  
J Biol Chem, 2001. **276**(26): 23639-44.
- 250 Renodon-Corniere, A., Jensen, L.H., Nitiss, J.L., et al., *Interaction of human DNA topoisomerase II alpha with DNA : quantification by surface plasmon resonance.*  
Biochemistry, 2002. **41**(45): 13395-402.
- 251 Gruz, P., Shimizu, M., Pisani, F.M., et al., *Processing of DNA lesions by archaeal DNA polymerases from Sulfolobus solfataricus.*  
Nucleic Acids Res, 2003. **31**(14): 4024-30.

- 252· Maesawa, C., Inaba, T., Sato, H., et al., *A rapid biosensor chip assay for measuring of telomerase activity using surface plasmon resonance.*  
Nucleic Acids Res, 2003. **31**(2): e4.
- 253· Grinberg, A.V. and Kerppola, T., *Both Max and TFE3 cooperate with Smad proteins to bind the plasminogen activator inhibitor-1 promoter, but they have opposite effects on transcriptional activity.*  
J Biol Chem, 2003. **278**(13): 11227-36.
- 254· Leontiou, C., Lightowlers, R., Lakey, J.H., et al., *Kinetic analysis of human topoisomerase IIalpha and beta DNA binding by surface plasmon resonance.*  
FEBS Lett, 2003. **554**(1-2): 206-10.
- 255· Schaufli, L.E. and Klevit, R.E., *Mechanism of DNA binding by the ADR1 zinc finger transcription factor as determined by SPR.*  
J Mol Biol, 2003. **329**(5): 931-9.
- 256· Hao, D., Ohme-Takagi, M., and Yamasaki, K., *A modified sensor chip for surface plasmon resonance enables a rapid determination of sequence specificity of DNA-binding proteins.*  
FEBS Lett, 2003. **536**(1-3): 151-6.
- 257· Tsoi, P.Y. and Yang, M., *Surface plasmon resonance study of the molecular recognition between polymerase and DNA containing various mismatches and conformational changes of DNA-protein complexes.*  
Biosens Bioelectron, 2004. **19**(10): 1209-18.
- 258· Teh, H.F., Peh, W.Y., Su, X., et al., *Characterization of protein-DNA interactions using surface plasmon resonance spectroscopy with various assay schemes.*  
Biochemistry, 2007. **46**(8): 2127-35.
- 259· Moyroud, E., Reymond, M.C., Hames, C., et al., *The analysis of entire gene promoters by surface plasmon resonance.*  
Plant J, 2009. **59**(5): 851-8.
- 260· Nguyen, B., Tanious, F.A., and Wilson, W.D., *Biosensor-surface plasmon resonance: quantitative analysis of small molecule-nucleic acid interactions.*  
Methods, 2007. **42**(2): 150-61.
- 261· Panayotou, G., Brown, T., Barlow, T., et al., *Direct measurement of the substrate preference of uracil-DNA glycosylase.*  
J Biol Chem, 1998. **273**(1): 45-50.
- 262· Johnson, K.A., Mierzwa, M.L., Fink, S.P., et al., *MutS recognition of exocyclic DNA adducts that are endogenous products of lipid oxidation.*  
J Biol Chem, 1999. **274**(38): 27112-8.
- 263· Purnapatre, K., Handa, P., Venkatesh, J., et al., *Differential effects of single-stranded DNA binding proteins (SSBs) on uracil DNA glycosylases (UDGs) from Escherichia coli and mycobacteria.*  
Nucleic Acids Res, 1999. **27**(17): 3487-92.
- 264· Fourrier, L., Brooks, P., and Malinge, J.M., *Binding discrimination of MutS to a set of lesions and compound lesions (base damage and mismatch) reveals its potential role as a cisplatin-damaged DNA sensing protein.*  
J Biol Chem, 2003. **278**(23): 21267-75.

- 265· Privezentzev, C.V., Saparbaev, M., and Laval, J., *The HAP1 protein stimulates the turnover of human mismatch-specific thymine-DNA-glycosylase to process 3,N(4)-ethenocytosine residues.* Mutat Res, 2001. **480-481**: 277-84.
- 266· Hegde, V., Wang, M., and Deutsch, W.A., *Characterization of human ribosomal protein S3 binding to 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites by surface plasmon resonance.* DNA Repair (Amst), 2004. **3**(2): 121-6.
- 267· Gros, L., Maksimenko, A.V., Privezentzev, C.V., et al., *Hijacking of the human alkyl-N-purine-DNA glycosylase by 3,N4-ethenocytosine, a lipid peroxidation-induced DNA adduct.* J Biol Chem, 2004. **279**(17): 17723-30.
- 268· Adhikari, S., Uren, A., and Roy, R., *Excised damaged base determines the turnover of human N-methylpurine-DNA glycosylase.* DNA Repair (Amst), 2009. **8**(10): 1201-6.
- 269· Fuchs, J., *Physicochemical study of DNA biochips. DNA duplex stability, point mutation detection and beyond.* Ph.D. thesis, Université Joseph Fourier, Grenoble, 2009.
- 270· Gerry, N.P., Witowski, N.E., Day, J., et al., *Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations.* J Mol Biol, 1999. **292**(2): 251-62.
- 271· Marietta, C., Gulam, H., and Brooks, P.J., *A single 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine lesion in a TATA box prevents binding of the TATA binding protein and strongly reduces transcription in vivo.* DNA Repair (Amst), 2002. **1**(11): 967-75.
- 272· Romieu, A., Gasparutto, D., and Cadet, J., *Synthesis and characterization of oligonucleotides containing 5',8-cyclopurine 2'-deoxyribonucleosides : (5'R)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine, (5'S)-5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine, and (5'R)-5',8-cyclo-2'-deoxyguanosine.* Chem Res Toxicol, 1999. **12**(5): 412-21.
- 273· Sidorenko, V.S., Mechetin, G.V., Nevinsky, G.A., et al., *Ionic strength and magnesium affect the specificity of Escherichia coli and human 8-oxoguanine-DNA glycosylases.* FEBS J, 2008. **275**(15): 3747-60.
- 274· Vermeer, A.W., Giacomelli, C.E., and Norde, W., *Adsorption of IgG onto hydrophobic teflon. Differences between the F(ab) and F(c) domains.* Biochim Biophys Acta, 2001. **1526**(1): 61-9.
- 275· Tsoi, P.Y. and Yang, M., *Kinetic study of various binding modes between human DNA polymerase beta and different DNA substrates by surface-plasmon-resonance biosensor.* Biochem J, 2002. **361**: 317-25.
- 276· Adhikari, S., Kennel, S.J., Roy, G., et al., *Discrimination of lesion removal of N-methylpurine-DNA glycosylase revealed by a potent neutralizing monoclonal antibody.* DNA Repair (Amst), 2008. **7**(1): 31-9.
- 277· Minetti, C.A., Remeta, D.P., Zharkov, D.O., et al., *Energetics of lesion recognition by a DNA repair protein : thermodynamic characterization of formamidopyrimidine-glycosylase (Fpg) interactions with damaged DNA duplexes.* J Mol Biol, 2003. **328**(5): 1047-60.
- 278· Piersen, C.E., McCullough, A.K., and Lloyd, R.S., *AP lyases and dRPases : commonality of mechanism.* Mutat Res, 2000. **459**(1): 43-53.

- 279 Kerins, S.M., Collins, R., and McCarthy, T.V., *Characterization of an endonuclease IV 3'-5' exonuclease activity.*  
J Biol Chem, 2003. **278**(5): 3048-54.
- 280 Budworth, H., Matthewman, G., O'Neill, P., et al., *Repair of tandem base lesions in DNA by human cell extracts generates persisting single-strand breaks.*  
J Mol Biol, 2005. **351**(5): 1020-9.
- 281 Levin, J.D., Johnson, A.W., and Demple, B., *Homogeneous Escherichia coli endonuclease IV. Characterization of an enzyme that recognizes oxidative damage in DNA.*  
J Biol Chem, 1988. **263**(17): 8066-71.
- 282 Motta, E.S., Souza-Santos, P.T., Cassiano, T.R., et al., *Endonuclease IV is the main base excision repair enzyme involved in DNA damage induced by UVA radiation and stannous chloride.*  
J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: 376218.
- 283 Saitoh, T., Shinmura, K., Yamaguchi, S., et al., *Enhancement of OGG1 protein AP lyase activity by increase of APEX protein.*  
Mutat Res, 2001. **486**(1): 31-40.

## LISTE DES FIGURES

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Structure de la molécule d'ADN.....                                                                                        | 10 |
| Figure 2 : Représentation schématique des différentes lésions de l'ADN .....                                                          | 11 |
| Figure 3 : Exemples de lésions oxydatives des bases de l'ADN.....                                                                     | 12 |
| Figure 4 : Formation d'une base 8-oxoG ou FapyG par attaque d'espèces réactives de l'oxygène (radical hydroxyle) sur la guanine ..... | 13 |
| Figure 5 : Réparation de la base 8-oxoG .....                                                                                         | 13 |
| Figure 6 : Exemples de lésions photochimiques sur des bases pyrimidiniques.....                                                       | 15 |
| Figure 7 : Dépôt d'énergie dans l'ADN par un rayonnement ionisant à haut TEL.....                                                     | 16 |
| Figure 8 : Les conséquences cellulaires d'une lésion de l'ADN .....                                                                   | 17 |
| Figure 9 : Schéma illustrant la réponse à une lésion de l'ADN .....                                                                   | 18 |
| Figure 10 : Les différentes voies de réparation de l'ADN.....                                                                         | 18 |
| Figure 11 : Recombinaison homologue et non homologue.....                                                                             | 20 |
| Figure 12 : Les deux voies de la BER chez l'Homme.....                                                                                | 23 |
| Figure 13 : Mécanisme des réactions catalysées par les ADN glycosylases .....                                                         | 25 |
| Figure 14 : Sites de clivage pour les AP endonucléases/lyases.....                                                                    | 26 |
| Figure 15 : Mécanisme réactionnel de la Fpg.....                                                                                      | 28 |
| Figure 16 : Mécanismes de coupure.....                                                                                                | 28 |
| Figure 17 : Mécanisme enzymatique de OGG1 .....                                                                                       | 30 |
| Figure 18 : Les voies possibles d'initialisation de la NER.....                                                                       | 32 |
| Figure 19 : Représentation schématique de la NER.....                                                                                 | 33 |
| Figure 20 : Protéines impliquées dans la réparation des mésappariements.....                                                          | 34 |
| Figure 21 : Schéma simplifié de la réparation par BER de 2 lésions proches.....                                                       | 36 |
| Figure 22 : Réparation et kinases .....                                                                                               | 38 |
| Figure 23 : Mécanisme de formation d'une mutation.....                                                                                | 41 |
| Figure 24 : Mécanisme proposé pour une interaction ADN/protéine .....                                                                 | 48 |
| Figure 25 : Etude des complexes ADN/protéines.....                                                                                    | 49 |
| Figure 26 : Technique EMSA.....                                                                                                       | 50 |
| Figure 27 : Mesure des activités de coupure sur gel.....                                                                              | 51 |
| Figure 28 : Analyse des produits de coupure de deux enzymes.....                                                                      | 52 |
| Figure 29 : Extension d'amorce d'un oligonucléotide lésé.....                                                                         | 53 |
| Figure 30 : Exemple d'application de crosslinking.....                                                                                | 54 |
| Figure 31 : Principe des biopuces à fluorescence .....                                                                                | 55 |
| Figure 32 : Dosage de l'activité Ape1 par une technique de fluorescence .....                                                         | 57 |
| Figure 33 : Deux approches analytiques pour le marquage photochimique .....                                                           | 57 |
| Figure 34 : Schéma simplifié pour l'utilisation de billes magnétiques.....                                                            | 59 |
| Figure 35 : Mécanisme d'action du NaBH <sub>4</sub> .....                                                                             | 60 |
| Figure 36 : Schéma simplifié pour l'utilisation du trapping avec billes magnétiques.....                                              | 60 |
| Figure 37 : Purification d'un complexe ADN/protéine à l'aide de billes magnétiques .....                                              | 61 |
| Figure 38 : Principe schématique de la réaction de Footprinting.....                                                                  | 62 |
| Figure 39 : Principe de la réalisation d'une électrophorèse bidimensionnelle.....                                                     | 64 |
| Figure 40 : Exemple d'électrophorèse bidimensionnelle .....                                                                           | 65 |
| Figure 41 : Schéma explicatif de la technique DIGE .....                                                                              | 66 |
| Figure 42 : Surface de la puce utilisée avec la technologie SELDI.....                                                                | 67 |
| Figure 43 : Représentation simplifiée d'un spectrophotomètre en flux stoppé.....                                                      | 68 |
| Figure 44 : Représentation schématique de 2 techniques de spectrométrie de masse.....                                                 | 69 |
| Figure 45 : Principe de la technique ICAT.....                                                                                        | 70 |
| Figure 46 : Surface Plasmon Resonance Mass Spectrometry.....                                                                          | 71 |
| Figure 47 : Exemple de fonctionnement de la SPR couplée à la LC-MS/MS .....                                                           | 73 |
| Figure 48 : Schéma du dispositif d'excitation pour la SPR.....                                                                        | 75 |
| Figure 49 : Biocapteur basé sur l'imagerie SPR .....                                                                                  | 77 |
| Figure 50 : Surface de la biopuce.....                                                                                                | 78 |
| Figure 51 : Sensorgramme montrant les différentes étapes d'un cycle analytique .....                                                  | 79 |
| Figure 52 : Greffage des zips .....                                                                                                   | 83 |

|                                                                                                           |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>Figure 53 : Test de la densité de greffage des plots .....</i>                                         | <i>84</i>  |
| <i>Figure 54 : Schéma rappelant l'hybridation des zips complémentaires .....</i>                          | <i>84</i>  |
| <i>Figure 55 : Sensorgramme montrant les différentes étapes d'hybridation.....</i>                        | <i>87</i>  |
| <i>Figure 56 : Construction de la puce en 3 étapes.....</i>                                               | <i>88</i>  |
| <i>Figure 57 : Influence du matériau utilisé pour la fluidique.....</i>                                   | <i>91</i>  |
| <i>Figure 58 : Injections de la protéine Fpg à des concentrations croissantes.....</i>                    | <i>92</i>  |
| <i>Figure 59 : Tests de compétition .....</i>                                                             | <i>94</i>  |
| <i>Figure 60 : Deux injections consécutives d'enzyme .....</i>                                            | <i>95</i>  |
| <i>Figure 61 : Exemple de courbe de dissociation thermique.....</i>                                       | <i>96</i>  |
| <i>Figure 62 : Mécanisme simplifié de l'action de la Fpg sur la lésion 8-oxoG .....</i>                   | <i>96</i>  |
| <i>Figure 63 : Principe de révélation de l'activité enzymatique de la Fpg .....</i>                       | <i>97</i>  |
| <i>Figure 64 : Révélation de l'activité catalytique de la Fpg après chauffage .....</i>                   | <i>97</i>  |
| <i>Figure 65 : Mécanisme d'action du NaBH<sub>4</sub>.....</i>                                            | <i>98</i>  |
| <i>Figure 66 : « Trapping » de la Fpg sur la base 8-oxoG .....</i>                                        | <i>99</i>  |
| <i>Figure 67 : Influence de la biotine .....</i>                                                          | <i>101</i> |
| <i>Figure 68 : Amplification du signal avec la streptavidine.....</i>                                     | <i>101</i> |
| <i>Figure 69 : Fpg et sites abasiques.....</i>                                                            | <i>104</i> |
| <i>Figure 70 : Test de Fpg mutée .....</i>                                                                | <i>104</i> |
| <i>Figure 71 : Action de Endo IV sur les sites abasiques .....</i>                                        | <i>105</i> |
| <i>Figure 72 : Action de l'enzyme Fpg sur nos lésions tandem .....</i>                                    | <i>106</i> |
| <i>Figure 73 : Représentation schématique de notre protocole avec des oligonucléotides biotinylés ...</i> | <i>107</i> |
| <i>Figure 74 : Action de l'enzyme EndoIV sur nos lésions tandem.....</i>                                  | <i>108</i> |
| <i>Figure 75 : Hypothèse expliquant les résultats obtenus avec l'enzyme EndoIV .....</i>                  | <i>109</i> |
| <i>Figure 76 : Résultat d'un gel retard.....</i>                                                          | <i>109</i> |
| <i>Figure 77 : Structure de la biotine .....</i>                                                          | <i>110</i> |
| <i>Figure 78 : Résultat de l'action de OGG1 sur les lésions tandem .....</i>                              | <i>110</i> |
| <i>Figure 79 : Action couplée de 2 enzymes sur nos lésions tandem .....</i>                               | <i>112</i> |

## LISTE DES TABLEAUX

|                                                                                                                |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>Tableau I : Différentes lésions de l'ADN .....</i>                                                          | <i>11</i>  |
| <i>Tableau II : ADN glycosylases humaines connues en 2009.....</i>                                             | <i>24</i>  |
| <i>Tableau III : Récapitulatif très simplifié des protéines impliquées dans les étapes de BER et NER .....</i> | <i>33</i>  |
| <i>Tableau IV : Eléments de radiobiologie .....</i>                                                            | <i>35</i>  |
| <i>Tableau V : Pathologies induites par des défauts de réparation de l'ADN.....</i>                            | <i>43</i>  |
| <i>Tableau VI : Techniques de révélation des taches protéiques sur gel de polyacrylamide .....</i>             | <i>65</i>  |
| <i>Tableau VII : Exemples d'études de DNA binding proteins par SPR.....</i>                                    | <i>81</i>  |
| <i>Tableau VIII : Exemples d'études d'ADN glycosylases par SPR.....</i>                                        | <i>82</i>  |
| <i>Tableau IX : Séquences étudiées en SPRI.....</i>                                                            | <i>89</i>  |
| <i>Tableau X : Liste des enzymes utilisées au cours de notre étude .....</i>                                   | <i>92</i>  |
| <i>Tableau XI : Estimation de l'activité Fpg .....</i>                                                         | <i>98</i>  |
| <i>Tableau XII : Tableau récapitulatif des actions des 3 enzymes purifiées sur 4 lésions isolées.....</i>      | <i>103</i> |
| <i>Tableau XIII : Récapitulatif des résultats obtenus sur nos lésions tandem.....</i>                          | <i>112</i> |



## SPR imaging for label-free multiplexed analyses of DNA *N*-glycosylase interactions with damaged DNA duplexes

Christelle Corne,<sup>†a</sup> Jean-Bernard Fiche,<sup>†b</sup> Didier Gasparutto,<sup>\*a</sup> Valérie Cunin,<sup>c</sup> Emmanuel Suraniti,<sup>b</sup> Arnaud Buhot,<sup>b</sup> Julia Fuchs,<sup>b</sup> Roberto Calemczuk,<sup>b</sup> Thierry Livache<sup>\*b</sup> and Alain Favier<sup>a,c</sup>

Received 21st January 2008, Accepted 3rd April 2008

First published as an Advance Article on the web 1st May 2008

DOI: 10.1039/b801086b

Base excision repair (BER) is the major mechanism for the correction of damaged nucleobases resulting from the alkylation and oxidation of DNA. The first step in the BER pathway consists of excision of the abnormal base by several specific DNA *N*-glycosylases. A decrease in BER activity was found to be related to an increased risk of carcinogenesis and aging. To investigate BER activities we set up a new device for DNA repair analysis based on surface plasmon resonance imaging (SPRi). Oligonucleotides bearing an abnormal nucleoside, namely 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and (5'*S*)-5',8-cyclopurine-2'-deoxynucleoside, were grafted by a pyrrole electro-copolymerization process on a glass prism coated with a gold layer. The latter label-free DNA sensor chip permits the detection of *N*-glycosylase/AP-lyase activity as well as the binding of repair proteins to DNA damage without cleavage activity. Thus, the Fapy DNA *N*-glycosylase (Fpg) protein is shown as expected to bind and then cleave its natural substrate, namely 8-oxo-7,8-dihydro-guanine, together with the resulting abasic site. Using the current SPR imaging-based DNA array we observed an original binding activity of Fpg towards the (5'*S*)-5',8-cycloAdenosine residue. These results altogether show that SPR imaging may be used to simultaneously and specifically detect recognition and excision of several damaged DNA nucleobases, and constitutes an interesting technique to screen inhibitors of DNA repair proteins.

### Introduction

Oxidative damage of DNA bases results from an attack upon our genome by various carcinogenic agents such as ionizing radiation, UV-A radiation, redox metals and other processes over-stimulating macrophages. Oxygen radical species create a broad range of DNA damage: abasic sites, oxidized bases, DNA strand breaks, inter- or intra-strand cross-links, cross-links to proteins or lipids.<sup>1,2</sup> Many oxidized bases have been identified in DNA, such as 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG), thymidine glycol (Tg), 5',8-cyclo-2'-deoxyriboseylpurines (5',8-cyclo-dPurines) and more than 50 different abnormalities.<sup>3,4</sup> In order to counteract the potential mutagenic and cytotoxic effects of the lesions, living organisms have evolved DNA repair mechanisms including excision, reversion and recombination pathways.<sup>3,6</sup> Among all the existing repair processes, the base

excision repair (BER) pathway, which is conserved from bacteria to mammals, is the major mechanism devoted to correct these latter base lesions.<sup>7-9</sup> The main features of BER deal with the recognition and removal of an aberrant base from the DNA by an *N*-glycosylase such as the bacterial Fapy DNA *N*-glycosylase (Fpg, also called *MutM*) or its eukaryote homolog oxoguanine DNA *N*-glycosylase1 (OGG1), followed by incision of the resulting AP-site by an AP-endonuclease or an AP-lyase. Repair is completed in subsequent steps by processing of the resulting termini, filling of the gap by polymerases and intervention of a ligase to re-seal the repaired strand.<sup>10</sup>

The presence of alterations within DNA is believed to be associated with cell death, aging and cancer.<sup>11-13</sup> Therefore, the correct functioning of the DNA repair machinery is crucial for the maintenance of genomic integrity and cell viability. Genetic studies have revealed direct correlations between defects in the repair of damaged bases and human disease. Thus several works have clearly shown that a decrease in base excision repair capabilities is linked to an increased risk of cancer (for a review see ref. 14). Paz-Elizur *et al.* have shown using an oligonucleotide (ODN) cleavage assay that low human oxoguanine DNA *N*-glycosylase1 (hOGG1) activity in blood peripheral mononuclear cells was associated with an increased risk of lung cancer.<sup>15</sup> Existing publications demonstrate the relationship between allelic variant or allelic loss of some genes belonging to the BER system and increased cancer risk.<sup>16</sup> In adults, many polymorphisms of DNA repair genes are linked

<sup>a</sup>Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques, SCIB/UMR E3 CEA-UJF, INAC, CEA-Grenoble, F-38054 Grenoble Cedex 9, France. E-mail: didier.gasparutto@cea.fr; Fax: +33-(0)4-38-78-50-90; Tel: +33-(0)4-38-78-45-58

<sup>b</sup>CREAB, SPiAM/UMR 5819 CEA-CNRS-UJF, INAC, CEA-Grenoble, F-38054 Grenoble Cedex 9, France. E-mail: thierry.livache@cea.fr; Fax: +33-(0)4-38-78-52-29; Tel: +33-(0)4-38-78-52-29

<sup>c</sup>Centre d'Investigation Biologique - CHU, Université Joseph Fourier, Grenoble, France

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

to an increase in the incidence of some cancers. Evidence exists regarding the presence of mutations in the human *MutY* gene and the development of colorectal adenoma and cancer.<sup>17–19</sup> Boiteux and co-workers have clearly shown that mutations in the *hOGG1* gene are present in human lung and kidney tumors.<sup>20</sup> Moreover, the cysteine-362 form of human *OGG1* has been shown to be more abundant in lung cancer than the serine isoform.<sup>21</sup> Paradoxically, most of the treatments used in cancer therapy act by damaging the DNA of tumor cells and so their efficiency is dependent on a high amount of DNA damage that results in tumor cell death. Thus, the expression of various genes involved in DNA repair of cross-linked, oxidized and alkylated bases can modulate the efficiency of chemotherapy.

As mentioned above, it will be important to measure DNA repair capacities to assess the risk of cancer or to search for new modulator drugs. As stated by Rosell *et al.*,<sup>22</sup> the possibility of individualizing DNA repair profiles is becoming a central issue in the search for improved chemotherapy results. However, the determination of excision repair activities is challenging and complex. Time-consuming experiments, mainly by using electrophoretic analyses coupled with the isotope labeling of damage-containing DNA fragments, are necessary to fully characterize such enzymatic repair capacities.

The development of new tools aimed at measuring the DNA repair capacities of small cell extracts should allow progress to be made on the knowledge of various aspects in the field of DNA repair. With regard to cancer biology we should be able to evaluate tumor heterogeneity with emphasis on DNA repair by investigating *in situ* activity on tissue slides. By screening patients *via* global DNA-repair assays we should be able to better understand which polymorphisms are directly responsible for poorly efficient repair. We should also have a tool to screen for chemical agents inhibiting DNA repair that will enable the selective inhibition of different pathways involved in the process. Such agents should allow a better determination of the molecular mechanisms of resistance to chemotherapeutic drugs or radiotherapy. In our laboratory we have thus far developed microarray-based assays aimed at measuring simultaneously the repair of various types of DNA damage by the BER mechanism.<sup>23,24</sup> The BER-targeting test consists of the elaboration and then the use of a miniaturized DNA-repair biochip based on the follow-up of the digestion by DNA *N*-glycosylases of fluorescently labeled oligonucleotides that have incorporated specific and different DNA lesions. Such biochips should allow the simultaneous evaluation of the repair capacity of various damages involving different DNA-repair pathways. Nonetheless, it will also be important to have complementary, miniaturized, label-free techniques to analyze DNA-binding and DNA-cleavage processes by DNA-repair enzymes. Such tools should allow the elaboration of global functional assays, which is of great interest for the discovery of new drugs modulating DNA repair by high throughput screening of chemical banks. So we introduce in the present paper a new, multiplexed, label-free technique, based on an original microdevice using base damage-containing DNA probes and surface plasmon resonance imaging (SPRi) detection to analyze the behavior of DNA *N*-glycosylase enzymes. The latter SPRi technique has long been used to study various biological processes such as DNA–protein and RNA–

protein interactions,<sup>25–29</sup> DNA–drug binding,<sup>30</sup> protein–protein interactions,<sup>31,32</sup> oligosaccharide–protein recognition<sup>33</sup> or DNA–DNA hybridization.<sup>34,35</sup> In the current work, we apply for the first time SPR imaging to assess DNA *N*-glycosylase binding and catalytic properties toward various oxidatively damaged DNA sites. The present SPRi-based assay should provide a powerful tool to further substantiate the role of repair capacity in the development of cancer and human health, and to develop screening platforms to search for new DNA-repair activity modulators.

## Materials and methods

### Reagents and general methods

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France). MALDI-ToF mass spectrometry measurements were performed with a Biflex spectrometer (Bruker), using 3-hydroxypicolinic acid as a matrix and ammonium citrate as a cation exchanger, as previously described.<sup>36</sup> Purified Fapy-DNA *N*-glycosylase enzyme was a gift of Dr Serge Boiteux (CEA Fontenay-aux-Roses, France).

### Synthesis and characterization of oligonucleotides

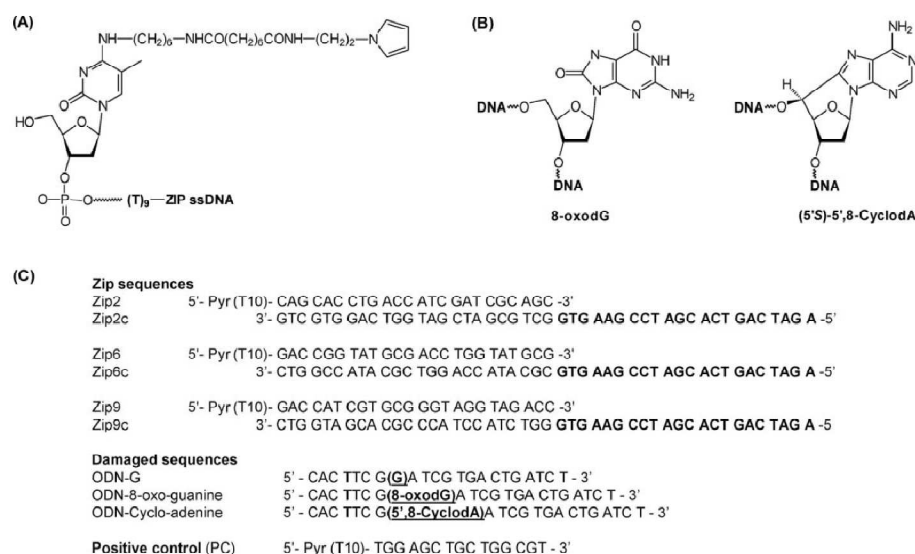
The target sequence used in the present study was a partial duplex DNA with a single-strand sequence complementary to a specific zip-code and a duplex section containing the oxidized base lesion (Scheme 1).

All oligonucleotide syntheses were carried out on an Applied Biosystems 392 DNA/RNA synthesizer using the phosphoramidite chemistry on a scale of 1  $\mu$ mol. The oligonucleotides that contain the pyrrole residue at the 5'-end position were synthesized following the previously described protocol [Scheme 1(A)].<sup>37</sup> The oligonucleotides that contain the 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and (5'*S*)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine lesions [Scheme 1(B)] were prepared following the previously described methodologies.<sup>38–40</sup> Upon completion, oligonucleotides were deprotected in concentrated aqueous ammonia for 20 h at 55 °C and then purified by preparative 20% denaturing PAGE using UV-shadowing detection or by reversed phase-HPLC. After desalting by size exclusion, the oligonucleotides were then quantified by UV measurements at 260 nm. Finally, the purity and the integrity of the synthetic DNA fragments were checked by RP-HPLC analyses together with MALDI-ToF mass measurements. Samples were then lyophilised and frozen at –20 °C until use.

### DNA chip manufacture

Zip-Pyr probes were grafted at defined locations on the gold surface. The DNA chips were prepared on a glass prism coated with a gold layer (thickness 50 nm; GenOptics, France) as follows. First, the prism was immersed in a solution containing ethanol and dodecanethiol for 10 min at room temperature in order to create a hydrophobic thiol monolayer. Then, the prism was rinsed with ethanol and deionised water (18.2 M $\Omega$  cm) and dried under a stream of argon. Finally, the DNA spots were made using a pyrrole copolymerization process as previously described.<sup>37</sup> Briefly, for each probe, an





**Scheme 1** (A) Structure of the pyrrole residue inserted at the 5'-end of the Zip ssDNA sequences to attach the latter fragments onto the SPRi biochip by electro-copolymerization. (B) Structure of the oxidatively generated DNA lesions, namely 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and (5'S)-5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine, inserted into the damaged duplexes and then studied on the DNA-repair SPRi biochip. (C) Oligodeoxyribonucleotide sequences and sandwich constructs used on the SPRi chip in the present study.

electro-polymerization solution containing 20 mM of pyrrole and 10  $\mu$ M of pyrrole-modified ODN was prepared. The electrolyte solution is composed of 20% dimethyl sulfoxide, 0.5% glycerol and 30% acetonitrile. We used lithium perchlorate as the electrolyte with a concentration of 0.15 M and the solution is finally completed with water. To attach the probes to the surface, the prism is set on a platform whose height is controlled by a servo-motor. To prepare the spots, a micro-pipette whose tip was modified with a platinum wire is used as an electrochemical cell. The tip is filled with 5  $\mu$ l of the solution and its *x-y* position on the prism is controlled by two other motors. The actual fixing of the probes onto the prism is then achieved using a home-made LabView program. When the contact between the solution and the gold surface is made, the grafting is carried out by applying an electric pulse of 2 V for 100 ms. The spots obtained with this method were around 400  $\mu$ m in diameter with a layer thickness of around 5 nm, as estimated by atomic force microscopy. The homogeneity of the chip is assessed by two different ways: the first by controlling the electrochemical charges such that they are the same for each spot (generally between 0.5–1  $\mu$ C); and the other by checking that the reflectivity *versus* angle of incidence curves are identical for each spot of the chip. From this protocol, the density of probes was estimated to be around 1–10 pmol cm<sup>-2</sup> and an array of 40 spots can be prepared on each single prism in about half an hour.

The probes were arrayed in different spots on the prism. Polypyrrole (Ppy) spots without ODN were used as a negative control whereas spots grafted with Positive Control (PC) probes served as a positive control. Each probe sequence was grafted five times (five spots) in order to control the reproducibility

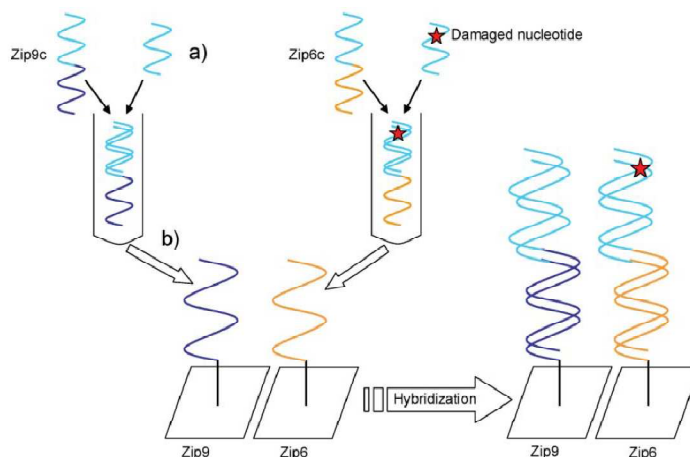
and the dispersion due to the electro-polymerization process and to search the optimal conditions for the further ODN–protein interaction experiments. The DNA chips were dried and stored at 4 °C under argon between each experiment. Note that the same chip can be used for more than 50 successive hybridizations before a significant decrease of the sensitivity is observed. Moreover, the detection threshold has been found in the 1–5 nM range, depending on the nature of the sequences used. This value is comparable to previous values reported in the literature.<sup>34,37</sup>

#### Selective DNA hybridization on the chip

The DNA binding sequences were hybridized on a specific area of the chip. To observe Fpg interactions with damaged DNA, a universal microarray approach was used as first developed by Gerry.<sup>41</sup> Oligonucleotide sequences can be filed into two categories: damaged sequences to study Fpg behavior as a function of the lesions (ODN-dG, ODN-8-oxodG and ODN-5',8-CyclodA) and Zip sequences to attach each lesion in a specific area of the chip (Scheme 1).

Zip probes (Zip2, 6 and 9) bear on their 5'-end a ten-thymine spacer to improve hybridization and a pyrrole moiety for the electro-polymerization grafting method. Zip targets (Zip2c, Zip6c and Zip9c) are 46-base sequences with 24 nucleotides on the 3'-side complementary to the Zip probes and 22 nucleotides on the 5'-side complementary to the oligonucleotides of interest.

All experiments were performed in a binding buffer containing 30 mM Tris HCl (pH 8), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M KCl, 1.3 mM



**Scheme 2** Hybridization strategy on the sensor biochip. (a) A first hybridization is performed between Zip targets and oligonucleotides of interest. (b) Then, duplexes are injected on the chip and hybridized with their specific probes grafted onto the gold surface. In this example, Zip9 duplexes do not contain damaged base and are used as control constructs to determine Fpg interactions with undamaged dsDNA.

disodium EDTA and 0.2 mM dithiothreitol (DTT) in deionised water, and the specificity of the hybridization reactions on the chip was controlled by SPRi. As illustrated in Scheme 2a, we separately performed hybridization between Zip targets and damaged oligonucleotides at 250 and 275 nM respectively (10% excess of the short strand). Mixtures were incubated at 90 °C for 3 min and allowed to cool slowly to room temperature to ensure hybridization reaction. Then, the entire volume (1 ml) was injected onto the chip (Scheme 2b) at 40 °C to overcome secondary structure effects on Zip sequence hybridization. A regeneration step of the DNA chip was achieved using an injection of NaOH at 100 mM for 1 min.

#### Protein binding on the DNA chip

Finally, Fpg protein was injected onto the chip and interactions with DNA were analyzed by SPR imaging. Fpg enzyme was over-expressed using recombinant *Escherichia coli*.<sup>42</sup> Fpg conservation buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2mM disodium EDTA, 150 mM NaCl, 30–50% glycerol. The concentration of the stored aliquots was 2.6 mg ml<sup>-1</sup>.

Interactions between damaged DNA and Fpg were observed by injecting 500 µl of the protein dilution at 25 °C with a constant flow rate of 1 µl s<sup>-1</sup> and registering the reflectivity variations for each of the spots on the chip. As Fpg/DNA complexes were mostly stabilized by electrostatic interactions, 1.5 M NaCl solution was used to remove bound Fpg without altering the DNA duplexes. This regeneration procedure does not alter the ability of the immobilized DNA to bind protein in subsequent cycles.

For these experiments three different controls were used: polypyrrole spots without DNA as negative control, PC and ODN-G DNA duplexes to observe Fpg interaction with unmodified ssDNA and dsDNA. Finally it should be noted that all

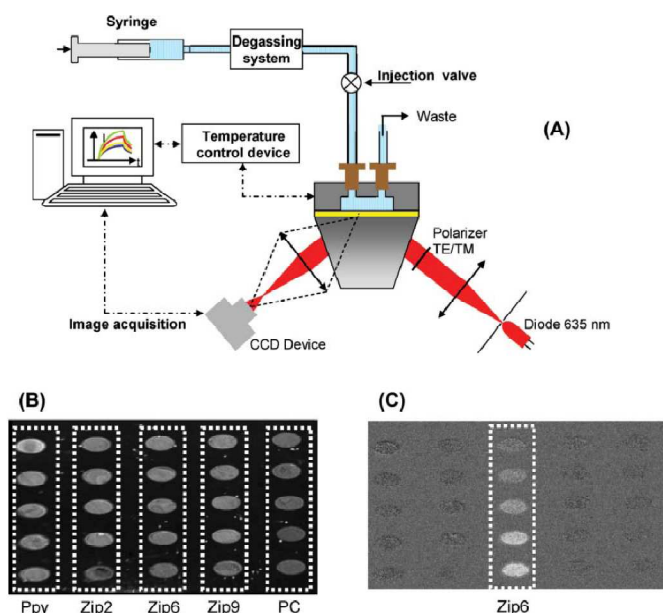
the experiments described in the present study were performed at least in triplicate.

#### SPR imaging set-up

SPR is a non-destructive optical method used to detect small changes of the refractive index/dielectric constant at the interface between a dielectric medium and a noble metal (generally water/gold for biological applications). Indeed, for a specific angle of incidence  $\theta$  in the total internal reflection domain, p-polarized photons are coupled to free electron modes of the gold. This phenomenon, called surface plasmon excitation, comes with a loss of the reflectivity and the best coupling angle  $\theta$  strongly depends on any variations of the refractive index/dielectric constant near the gold surface (for reviews see refs 43 and 44).

The set-up we use is a classical SPR imaging apparatus (GenOptics, Orsay, France) equipped with a diode source ( $\lambda = 635$  nm) and used to follow the hybridization kinetics as described previously.<sup>45</sup> The light is p-polarized and the intensity reflected by the gold surface is monitored using a CCD camera (Pixelfly 230XS); the prism is used in the Kretschmann configuration [Scheme 3(A)].

In order to achieve the best sensitivity, the angle of incidence  $\theta$  must match with the maximum slope of the reflectivity *versus*  $\theta$  curve (reflectivity range between 20 and 40% for an angle of incidence above the minimum of reflectivity). LabView software (GenOptics, Orsay, France) allowed for real-time and parallel monitoring of the reflectivity for each spot of the chip. Briefly, the CCD device registers images of the entire surface [see Scheme 3(B)]. These images are processed by the software in order to associate with each spot of the chip an average value of the reflectivity. To this purpose, a mask of the chip is registered at the beginning of the experiment and assigns a well-defined area on the surface to each spot. Thus, by registering an image



**Scheme 3** (A) The SPRi experimental set-up is composed of an LED as the light source ( $\lambda = 635$  nm). The light is polarized in TE or TM mode by a polarizer and it illuminates the functionalized gold layer in contact with the heating flow cell. Reflectivity changes of each spot are followed using a CCD camera monitored by a LabView interface. A degassing system is used to prevent bubble formation in the flow cell during experiments. (B) Image of the DNA chip as seen from the CCD. Owing to SPR properties and the angle of incidence we used for the experiment, the gold appears darker than the spots. (C) Differential image registered during an injection of Zip6c targets. This picture is obtained by subtracting the image of the chip during the hybridization process with an image registered before injecting the targets. As a result, only the spot where hybridization occurs is revealed. The increase of intensity from top to bottom is correlated to an increase of the density of probes.

of the chip every 1 or 2 s, the program is able to reconstruct the reflectivity curves in real-time for each spot. Ultimately, the specificity of the reactions can be quickly assessed using differential images. During the reaction, snapshots of the chip are subtracted from a reference picture, registered before the injection of the targets/proteins. In doing so, only spots where a reaction occurs appear brighter on the differential image. As an example, Scheme 3(C) displays what can be observed after an injection of Zip6c targets. As expected, only spots where Zip6 probes were immobilized are glowing, illustrating the specificity of the hybridization process.

The original part of this set-up pertains to the use of a home-made heating flow cell with a 4  $\mu$ l hybridization chamber.<sup>35</sup> The body of the cell is made of stainless steel, a bio-compatible material with good thermal conductivity. A Viton o-ring is used to prevent leaking and the tubing was made of PEEK (polyetheretherketone). The chamber is then heated using a resistor glued onto the top part of the stainless steel body. The temperature is measured using a negative temperature coefficient resistor and is regulated by electrical heating using a PID controller (Oxford ITC503). The buffer, whose flow rate is controlled by a syringe pump, is carefully and continuously degassed using an online degasser to prevent bubble formation. Using this set-up we are able to regulate the temperature in the chamber from 25 to 70 °C with a precision below 0.1 °C.

## Results and discussion

### General considerations regarding the SPRi microdevice and the related analyses

To prevent non-specific interactions between proteins and the gold surface, Bovine Serum Albumin (BSA) is often injected at the beginning of the experiments. Nevertheless, during Fpg injections, the non-specific signal was generally higher for surfaces blocked with BSA than for a bare gold surface. We suppose this phenomenon to be due to electrostatic interactions between both proteins since Fpg and BSA are respectively positively and negatively charged at pH 8. To overcome this problem, we use Cytochrome C (CytC) which is a 15 kDa protein with an isoelectric point close to Fpg. Then, two injections of CytC at 2  $\mu$ M are sufficient to prevent all non-specific interactions between Fpg and the gold surface or polypyrrole.

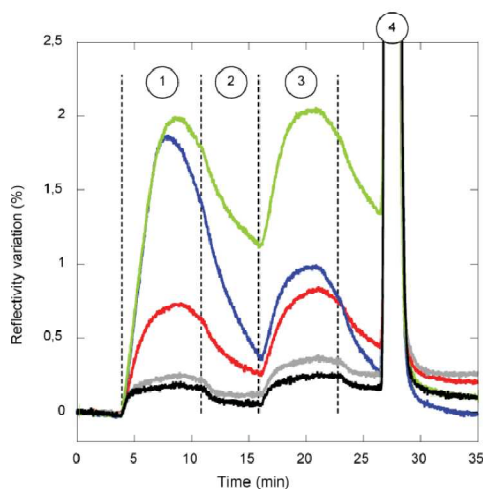
In addition, Fpg can interact with the Teflon (polytetrafluoroethylene) tubing used for continuous flow experiments. This phenomenon was observed with IgG antibody<sup>46</sup> and it probably induces protein adsorption and denaturation in our case. Indeed, the more Fpg proteins were in contact with the Teflon tubing of the fluidic device, the less the recognition signal measured by SPRi was important. Moreover, when Fpg is injected on the chip, we first observe an increase of the reflectivity due to Fpg/DNA interactions followed, after few minutes, by a decrease, probably



due to protein denaturation by Teflon. To minimize these effects, we replaced Teflon with PEEK tubing, which led to a better stability of Fpg and, consequently, a more reproducible SPR signal.

#### Damaged DNA recognition by Fpg protein

A typical set of SPR curves obtained after an injection of Fpg at 50 nM and 25 °C is displayed in Fig. 1 (time period 1). Interestingly, three different behaviors can be distinguished: a strong and specific interaction with damaged DNA containing 8-oxodG and (5'S)-5',8-CyclodA lesions, a weaker interaction with undamaged dsDNA and, finally, no reaction for the controls (Ppy and ssDNA).



**Fig. 1** Reflectivity data for Fpg/DNA interaction kinetics on the sensor chip for dsDNA without damage (red curve), 8-oxodG lesion (blue curve) and (5'S)-5',8-CyclodA (green curve). The black curve corresponds to the polypyrrole control and the grey one to the ssDNA spot. Curves are obtained as follows: after a first injection of Fpg at 50 nM and  $T = 25$  °C during 7 min (1), the chip surface is rinsed with the binding buffer (2); then, another Fpg injection is performed under the same conditions (3) and, finally, the surface is regenerated with a 1.5 M NaCl solution (4).

The weak variation of reflectivity ( $<0.3\%$ ) observed on the polypyrrole spots confirms the ability of CytC to block the surface and prevent non-specific interactions between the Fpg enzyme and the pyrrole matrix. As expected from the literature,<sup>47–50</sup> the presence of ssDNA on the spot does not seem to promote any specific interaction with Fpg. Indeed, as illustrated in Fig. 1, the variations of reflectivity measured on Ppy and ssDNA spots are quite the same, leading to the conclusion that Fpg does not specifically interact with ssDNA. In contrast, a specific signal ( $0.75\%$ ) is clearly observed for spots containing dsDNA on Fig. 1, providing evidence for the formation of dsDNA/Fpg complexes. Indeed, as described in the literature, recognition of lesions by Fpg is a combination of two different mechanisms.<sup>47–50</sup> First, electrostatic interactions between the enzyme and the DNA double helix lead to the

formation of an Fpg/DNA complex. Then, Fpg moves along the double helix using a processive mechanism and tests each base to detect the presence of a lesion.<sup>51</sup> This second interaction is actually well illustrated in Fig. 1 (time period 1) for spots containing 8-oxodG or (5'S)-5',8-CyclodA lesions. The variation of reflectivity (approx. 1.8–2%) is indeed more than twice that observed for undamaged dsDNA, revealing the specific recognition of those two lesions by Fpg.

In order to test the possible enzymatic activity of Fpg with these two lesions, a second injection of Fpg is performed under the same conditions. As illustrated in Fig. 1 (time period 3), the SPR curves are the same as for the first injection except for spots containing 8-oxodG. Indeed, for the 8-oxodG curve, the reflectivity decreased by a factor of two between both injections, which means that the Fpg substrate was modified during the first injection. This variation could be explained by the well-known Fpg-mediated enzymatic excision activity toward the 8-oxodG lesion:<sup>52–54</sup> after the first Fpg injection, a large part of the 8-oxodG lesions has been removed and then Zip duplexes bearing a gap are formed. In fact, Fpg recognition of processed duplexes only relies upon non-specific electrostatic interactions, which explains why the current reflectivity is then equal to that of the undamaged duplex.

On the other hand, the Fpg enzyme clearly binds the (5'S)-5',8-CyclodA lesion but it does not seem to have any enzymatic excision activity toward this lesion. Indeed, no change of the SPR signal has been observed between both injections (see Fig. 1). The latter experiment has been repeated several times without detecting any relevant change of the reflectivity for the spots containing this lesion. Let us notice that an injection of a 1.5 M NaCl solution allows complete regeneration of the chip by screening the electrostatic interactions [see Fig. 1 (time period 4)]. This result stresses the importance of those interactions for the stability of the (5'S)-5',8-CyclodA/Fpg complex.

In addition to this qualitative analysis, a more quantitative analysis of the non-specific interaction kinetics of Fpg with dsDNA is possible. From the SPR curves, we extract, from an injection of Fpg at 50 nM followed by the rinsing without Fpg, the forward and reverse rate constants ( $k_1 = 6.7 \pm 2.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $k_{-1} = 6.7 \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , respectively). These rate constants lead to a dissociation constant  $K_d = 100 \pm 30 \text{ nM}$ , a value which is lower than other data found in the literature, from stopped-flow techniques, for instance, measured for a 12-mer DNA fragment.<sup>55,56</sup> Indeed, our rate constants are significantly different from those observed in solution. This may be due to the biochip surface that affects significantly the interaction kinetics. Moreover, it has been well reported that such DNA–protein interactions strongly depend upon the nature and length of the DNA sequence, leading to a dispersion of the dissociation constant over two orders of magnitude.<sup>55</sup> According to the latter work, the longer the sequence is, the lower the dissociation constant would be, which is consistent with our observations since sequences of 46 bases long instead of 12 bases are used in the current study.

The non-specific interaction of Fpg with dsDNA is the simplest case to determine quantitatively since only two parameters,  $k_1$  and  $k_{-1}$ , are necessary. However, when considering the interaction between Fpg enzyme and damaged DNA, the analysis is far more complex since at least three mechanisms

are involved. First, the formation of a non-specific DNA/Fpg complex followed by recognition of the lesion and the formation of a specific lesion/Fpg complex. Then, depending on the lesion, the enzymatic reaction leads to the formation of a gap and the dissociation of the enzyme. Furthermore, in this case, it is difficult to observe these mechanisms separately by SPR and thus extract the large number of necessary parameters needed to model the different mechanisms involved.

As a conclusive remark, we have been able to demonstrate the ability of Fpg to interact specifically with two different lesions: 8-oxodG and (5'S)-5',8-CyclodA. For the former, we also observed the enzymatic activity by comparing how the SPR kinetics changed with successive injections of Fpg. For the latter cyclonucleoside residue, however, no enzymatic excision activity seems to occur (*vide infra* for further details). The reproducibility of these results has been demonstrated many times, either on the same chip by repeating the whole hybridization step (see Scheme 2) or by using another chip.

#### Fpg/(5'S)-5',8-CyclodA interaction analyses

Fig. 2(A) shows the reflectivity variations measured by SPRi for a 12 nM Fpg injection. We observe a specific signal for dsDNA with identical kinetics for the three first minutes of the injection. Then, the reflectivity measured for undamaged dsDNA spots reaches equilibrium while it increases continuously for duplexes containing the (5'S)-5',8-CyclodA lesion. Therefore, it appears that Fpg protein can specifically recognize and bind the (5'S)-5',8-CyclodA lesion but no enzymatic cleavage reaction was observed as previously seen in Fig. 1. The latter binding property of Fpg toward several 5',8-cyclo-2'-deoxyriboseylpurine lesions was confirmed in our group by several electrophoresis mobility shift assays.<sup>57</sup> Indeed, contrary to 8-oxodG spots, successive injections of Fpg at the same concentration always gives the same signal for dsDNA containing (5'S)-5',8-CyclodA.

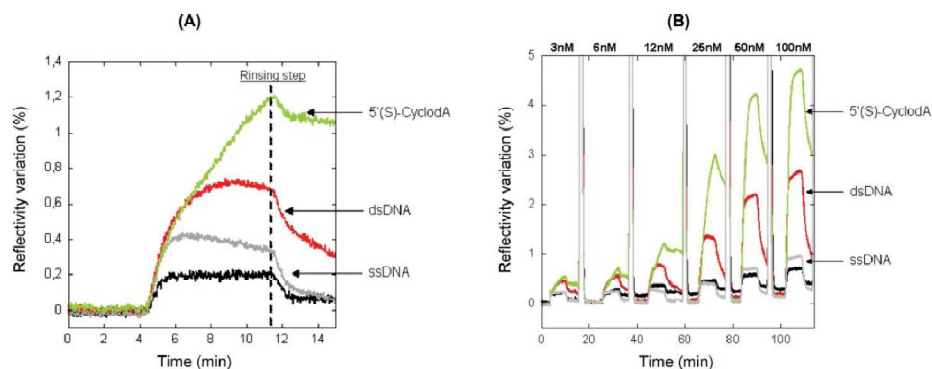
Differences are also observed in the dissociation kinetics. Indeed, after the Fpg injection, reflectivity continuously decreases for all spots except those containing the (5'S)-5',8-CyclodA

lesion. For the latter, we notice a slow dissociation, which suggests that Fpg can interact with (5'S)-5',8-CyclodA and form a stable complex with it. However, as illustrated on Fig. 2(B), this behavior becomes less obvious as the Fpg concentration is increased. Indeed, as already explained above, Fpg recognition of damaged DNA occurs in two different steps: the first one is a non-specific electrostatic interaction between the glycosylase and the duplex; then, the second step is processive scanning until lesion detection is achieved.<sup>58</sup> Thus, as duplexes are 46 bases long, more than one glycosylase can interact with the same sequence but only one can eventually form a stable complex with the lesion. So, it explains why for concentrations higher than 25 nM that the kinetics of dissociation became faster since we did not only observe dissociation of Fpg/lesion complexes.

To conclude, Fpg can specifically interact with the (5'S)-5',8-CyclodA lesion to form a stable complex but no obvious enzymatic activity can be detected by SPRi. Thus, this reaction is perfectly reversible and complex dissociation is accelerated by increasing the ionic strength [using NaCl solution at 1.5 M for example as illustrated on Fig. 2(B)] or the buffer flow rate (data not shown). Moreover, the sensitivity threshold for the detection is about 3 nM when working with purified Fpg. All these results suggest that (5'S)-5',8-CyclodA, and to a larger extent the 5',8-cyclopurine residues, may act as a trap for DNA *N*-glycosylases and could then decrease the ability of the cell to repair damaged DNA nucleobases by acting as a competitive inhibitor. This result appears of particular interest and points out the toxicity of such oxidatively generated cyclonucleoside damage toward the BER pathway, in addition to that recently reported in the literature.<sup>59–64</sup>

#### Detection of Fpg glycosylase activity

We have seen that Fpg enzymatic activity on 8-oxodG can be revealed by an important decrease of the reflectivity after the excision of the lesion (Fig. 1). Nevertheless, these results are obtained in an ideal case, with purified proteins and synthetic oligonucleotides. The enzymatic reaction is then quickly and



**Fig. 2** (A) Injection of Fpg protein at 12 nM and 25 °C. The black curve corresponds to the polypyrrole spot and the grey one corresponds to the ssDNA spot. Strong specific signals are observed on the dsDNA and 5'(S)-CyclodA spots. After the Fpg injection, we observe fast dissociation kinetics on Ppy, ssDNA and dsDNA spots while reflectivity remains quite steady for the 5'(S)-CyclodA damaged sequences. (B) Injections of Fpg at 3, 6, 12, 25, 50 and 100 nM, 25 °C and a flow rate of 4 ml h<sup>-1</sup>. Each injection was followed by regeneration of the DNA chip with a 1.5 M solution of NaCl.

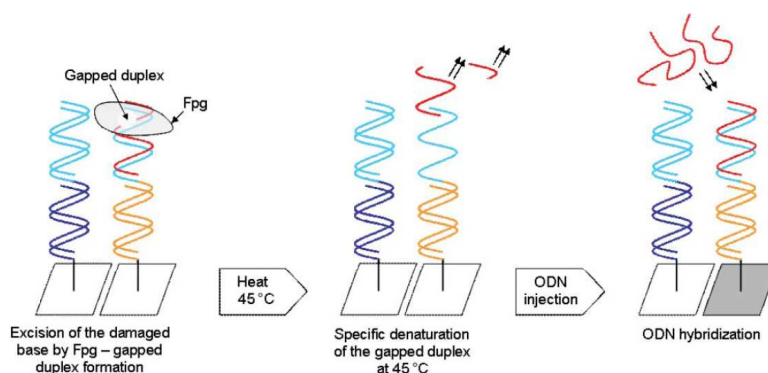


easily observed as non-specific interactions are reduced and Fpg is injected at concentrations higher than 50 nM.

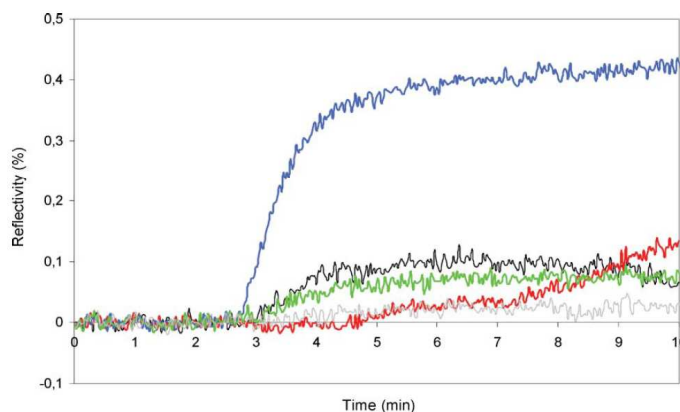
However, in a non-ideal case, all these conditions may not be fulfilled and it will be useful to detect Fpg activity using an indirect method. As described in the literature, the Fpg protein removes 8-oxodG and then excises the resulting apurinic site through successive 3'- and 5'-phosphate cleavages, results of beta- and delta-elimination. The final product of the Fpg action is thus a single nucleotide gap in DNA flanked by two phosphate groups. Indeed, gapped duplexes are formed on the chip after excision of the lesion, and damaged sequences are consequently shared into two distinct sequences. For example, in our case, two short sequences of 7 and 14 bases are obtained after Fpg activity on a damaged nucleotide (see Scheme 1). These short duplexes are only obtained when the lesion is removed during Fpg enzymatic activity. Otherwise, there is no change and the sequences are still 22 nucleotides long.

Thus, to discern gapped duplexes from the other type, we use a specific denaturation method whose principle is as follows: since short duplexes are less stable, there is a range of temperatures where short duplexes (less than 14 bases) quickly denature while long ones are still stable (22 bases). In our case, as illustrated on Scheme 4, we expect that gapped duplexes denature entirely when the chip is heated and left for 3 min at 45 °C. Previous experiments have been performed to ensure that all duplexes are thermodynamically stable at this temperature.

To validate this idea, several injections of Fpg are first performed on the chip to ensure that 8-oxodG lesions have been properly removed (see Fig. 1). Then, the chip is heated for 3 min at 45 °C and allowed to cool to 30 °C. When the SPRi signal is steady, ODN sequences are injected and we observe a specific hybridization signal only on spots where duplexes containing 8-oxodG lesion have been previously hybridized, as illustrated on Fig. 3. This experiment has been repeated



**Scheme 4** Fpg DNA repair activity can be observed using specific temperature denaturation. After 8-oxodG recognition, there is a reaction cascade including excision of the damaged nucleotide by Fpg. Two short strands (7-mer and 14-mer) are formed which quickly denature at 45 °C compared to the unmodified duplexes (22-mers). Consequently, after 3 min at 45 °C, all of the gapped duplexes dissociate and we observe specific hybridization by injecting the complementary sequence onto the chip.



**Fig. 3** After a denaturation step at 45 °C, the initial Fpg activity toward 8-oxodG is revealed by an injection and a specific re-annealing of the DNA complementary strand (30 °C and 250 nM) (blue curve). No hybridization is observed on the other non-cleaved double-stranded DNA fragments [red curve for ODN-G, green curve for ODN-5'(S)-CyclodA, black curve for Ppy and grey curve for ssDNA].



several times on different chips to ensure that this variation was not an artifact. Thus, the hybridization signal shown in Fig. 3 reveals Fpg catalytic activity on damaged duplexes containing the 8-oxodG lesion. It also confirms that Fpg can specifically interact with the (5′S)-5′,8-CyclodA lesion without glycosylase and lyase activity since no hybridization is measured. Finally, the use of temperature-driven denaturation reveals itself as a quick and easy way to indirectly assess the enzymatic activity of Fpg, depending on the nature of the lesions. We indeed took advantage of the destabilizing effect of a cleavage site to selectively denature duplexes processed by the Fpg enzyme. It must be stressed here that the ODN denaturation cannot be observed by SPR since the variation of reflectivity due to the change in temperature is too important. Indeed, the refractive index of water is strongly dependent on temperature and a variation of 20 °C leads to a variation of reflectivity of about 6–7%. Knowing the expected change of reflectivity due to the denaturation of a 22-base ODN is on average around 0.6–0.8%,<sup>65</sup> this signal is simply concealed by the variation due to the temperature.

### Concluding remarks

Compared to other techniques used to measure DNA-repair activities, SPR presents many advantages: it does not need labeling of the DNA, it allows the detection of binding as well as excision steps, and it does not denature proteins. Few applications of SPR to DNA-repair studies have been also reported. Accordingly, the binding of ribosomal protein S3 to 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites or the processing of uracil lesions by the uracil-DNA *N*-glycosylase repair enzyme have been investigated by surface plasmon resonance.<sup>66,67</sup>

SPR imaging not only presents a similar interest as classical SPR, as we demonstrated in the current study for Fpg protein, but also offers a simultaneous detection of enzyme activity toward several DNA damage targets. Indeed, by using pyrrole electro-copolymerization we were able to graft oligonucleotides bearing an abnormal base onto a glass prism coated with a gold layer without introducing further damage to the sequence. Then the resulting DNA-based biosensor was used to measure, for the first time in a simultaneous manner, the fixation and cleavage activities of DNA *N*-glycosylase repair enzymes by plasmon resonance imaging, in a rapid, miniaturized and multiplexed format. The current findings clearly demonstrate that *E. coli* Fpg was not only able, as expected, to bind and excise its natural 8-oxo-7,8-dihydro-2′-deoxyguanosine substrate, but also to bind to (5′S)-5′,8-cyclo-2′-deoxyadenosine. Our data unambiguously demonstrate the specificity for DNA binding and DNA *N*-glycosylase activities of the observed signal. Finally, the SPR imaging-based DNA array constitutes an efficient, label-free biochip technology that may be used to simultaneously and specifically analyze, in real-time, the enzymatic recognition and processing of several DNA damages and then be applied to screen DNA-repair activity-modulating drugs. Work is currently in progress in our laboratory to extend the applications of this SPRi device to enzymatic DNA-repair activity analyses with purified eukaryote DNA *N*-glycosylases or directly in cell extracts.

### Acknowledgements

The authors thank Dr Serge Boiteux (DSV, CEA Fontenay-aux-Roses, France) for the kind gift of *E. coli* Fpg enzyme. The contribution of Christine Saint-Pierre (SCIB-INAC, DSM, CEA Grenoble) for MALDI-ToF mass spectrometry measurements of DNA probes is gratefully acknowledged. We thank the Nanobio project (Grenoble, France) for financial support.

### References

- 1 T. Lindahl, *Nature*, 1993, **362**, 709–715.
- 2 J. Cadet, T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J.-P. Pouget, J.-L. Ravanat and S. Sauvaigo, *Mutat. Res.*, 1999, **424**, 9–21.
- 3 C. J. Burrows and J. G. Muller, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1109–1152.
- 4 J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto and J.-L. Ravanat, *Mutat. Res.*, 2003, **531**, 5–23.
- 5 O. D. Scharer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 2946–2974.
- 6 J. H. Hoeijmakers, *Nature*, 2001, **411**, 366–374.
- 7 H. E. Krokan, R. Standal and G. Slupphaug, *Biochem. J.*, 1997, **325**, 1–16.
- 8 S. S. David and S. D. Williams, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1221–1262.
- 9 P. Fortini, B. Pascucci, E. Parlanti, M. D’Errico, V. Simonelli and E. Dogliotti, *Biochimie*, 2003, **85**, 1053–1071.
- 10 E. Dogliotti, P. Fortini, B. Pascucci and E. Parlanti, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 2001, **68**, 3–27.
- 11 B. N. Ames and L. S. Gold, *Mutat. Res.*, 1991, **250**, 3–16.
- 12 J. R. Mitchell, J. H. Hoeijmakers and L. J. Niedernhofer, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2003, **15**, 232–240.
- 13 S. Bjelland and E. Seeberg, *Mutat. Res.*, 2003, **531**, 37–80.
- 14 S. S. David, V. L. O’Shea and S. Kundu, *Nature*, 2007, **447**, 941–950.
- 15 T. Paz-Elizur, M. Krupsky, S. Blumenstein, D. Elinger, E. Schechtman and Z. Livneh, *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003, **95**, 1312–1319.
- 16 E. L. Goode, C. M. Ulrich and J. D. Potter, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2002, **11**, 1513–1530.
- 17 E. Chow, C. Thirlwell, F. Macrae and L. Lipton, *Lancet Oncol.*, 2005, **5**, 600–606.
- 18 J. R. Sampson, S. Jones, S. Dolwani and J. D. Cheadle, *Biochem. Soc. Trans.*, 2005, **33**, 679–683.
- 19 J. D. Cheadle and J. R. Sampson, *DNA Repair*, 2007, **6**, 274–279.
- 20 S. Chevillard, J. P. Radicella, C. Levalois, J. Lebeau, M. F. Poupon, S. Oudard, B. Dutrillaux and S. Boiteux, *Oncogene*, 1998, **16**, 3083–3086.
- 21 L. Le Marchand, T. Donlon, A. Lum-Jones, A. Seifried and L. R. Wilkens, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2002, **11**, 409–412.
- 22 R. Rosell, R. V. Lord, M. Taron and N. Reguart, *Lung Cancer*, 2002, **38**, 217–227.
- 23 V. Gerniou, D. Rapin, J. F. Millau, E. Bufflier, A. Favier, J. Cadet and S. Sauvaigo, *Appl. Nanosci.*, 2004, **1**, 39–46.
- 24 S. Sauvaigo, V. Guerniou, D. Rapin, D. Gasparutto, S. Caillat and A. Favier, *Anal. Biochem.*, 2004, **333**, 182–192.
- 25 G. J. Wegner, H. J. Lee, G. Marriott and R. M. Corn, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 4740–4746.
- 26 C. Leontiou, R. Lightowlers, J. H. Lakey and C. A. Austin, *FEBS Lett.*, 2003, **554**, 206–210.
- 27 E. Maillart, K. Brengel-Pesce, D. Capela, A. Roget, T. Livache, M. Canva, Y. Levy and T. Soussi, *Oncogene*, 2004, **23**, 5543–5550.
- 28 Y. Li, H. J. Lee and R. M. Corn, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 6416–6424.
- 29 E. Bouffartigues, H. Leh, M. Anger-Leroy, S. Rimsky and M. Buckle, *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, e39.
- 30 L. K. Wolf, Y. Gao and R. M. Georgiadis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 10503–10511.
- 31 H. S. Ro, B. H. Koh, S. O. Jung, H. K. Park, Y. B. Shin, M. G. Kim and B. H. Chung, *Proteomics*, 2006, **7**, 2108–2111.
- 32 J. S. Yuk, H. S. Kim, J. W. Jung, S. H. Jung, S. J. Lee, W. J. Kim, J. A. Han, Y. M. Kim and K. S. Ha, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, **21**, 1521–1528.
- 33 E. A. Smith, W. D. Thomas, L. L. Kiessling and R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 6140–6148.
- 34 B. P. Nelson, T. E. Grimsrud, M. R. Liles, R. M. Goodman and R. M. Corn, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 1–7.

- 35 J. B. Fiche, A. Buhot, R. Calemczuk and T. Livache, *Biophys. J.*, 2007, **92**, 935–946.
- 36 D. Gasparutto, C. Saint-Pierre, M. Jaquinod, A. Favier and J. Cadet, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, 2003, **22**, 1583–1586.
- 37 T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan and R. Teoule, *Nucleic Acids Res.*, 1994, **22**, 2915–2921.
- 38 A.-G. Bourdat, D. Gasparutto and J. Cadet, *Nucleic Acids Res.*, 1999, **27**, 1015–1024.
- 39 A. Romieu, D. Gasparutto, D. Molko and J. Cadet, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 5245–5249.
- 40 D. Gasparutto, A.-G. Bourdat, C. D'Ham, V. Duarte, A. Romieu and J. Cadet, *Biochimie*, 2000, **82**, 19–24.
- 41 N. P. Gerry, N. E. Witowski, J. Day, R. P. Hammer, G. Barany and F. Barany, *J. Mol. Biol.*, 1999, **292**, 251–262.
- 42 S. Boiteux, T. O'Connor and J. Laval, *EMBO J.*, 1987, **6**, 3177–3183.
- 43 W. Knoll, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 1998, **49**, 569–638.
- 44 J. M. Brockman, B. P. Nelson and R. M. Corn, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2000, **51**, 41–63.
- 45 P. Guedon, T. Livache, F. Martin, F. Lesbre, A. Roget, G. Bidan and Y. Levy, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 6003–6009.
- 46 A. W. P. Vermeer, C. E. Giacomelli and W. Norde, *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, **1526**, 61–69.
- 47 J. C. Fromme and G. L. Verdine, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 51543–51548.
- 48 D. O. Zharkov, G. Shoham and A. P. Grollman, *DNA Repair*, 2003, **2**, 839–862.
- 49 S. Kuznetsova, A. Rykhlevskay, M. Taranenko, O. Sidorkina, T. Oretskaya and J. Laval, *Biochimie*, 2003, **85**, 511–519.
- 50 G. W. Buchko, K. Mc. Ateer, S. S. Wallace and M. A. Kennedy, *DNA Repair*, 2005, **4**, 327–339.
- 51 A. Banerjee, W. L. Santos and G. L. Verdine, *Science*, 2006, **311**, 1153–1157.
- 52 B. Castaing, A. Geiger, H. Seliger, P. Nehls, J. Laval, C. Zelwer and S. Boiteux, *Nucleic Acids Res.*, 1993, **21**, 2899–2905.
- 53 J. Tchou, V. Bodepudi, S. Shibutani, I. Antoshechkin, J. Miller, A. P. Grollman and F. Johnson, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 15318–15324.
- 54 K. Asagoshi, T. Yamada, H. Terato, Y. Ohyama, Y. Monden, T. Arai, S. Nishimura, H. Aburatani, T. Lindahl and H. Ide, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 4956–4864.
- 55 O. S. Fedorova, G. A. Nevinsky, V. V. Koval, A. A. Ishchenko, N. L. Vasilenko and K. T. Douglas, *Biochemistry*, 2002, **41**, 1520–1528.
- 56 D. O. Zharkov, A. A. Ishchenko, K. T. Douglas and G. A. Nevinsky, *Mutat. Res.*, 2003, **531**, 141–156.
- 57 E. Muller, Ph.D. Thesis, University of Grenoble, France, 2002 (Supervisors: J. Cadet and D. Gasparutto).
- 58 A. W. Francis and S. S. David, *Biochemistry*, 2003, **42**, 801–810.
- 59 I. Kuraoka, C. Bender, A. Romieu, J. Cadet, R. D. Wood and T. Lindahl, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**, 3832–3837.
- 60 P. J. Brooks, D. S. Wise, D. A. Berry, J. V. Kosmoski, M. J. Smerdon, R. L. Somers, H. Mackie, A. Y. Spoonde, E. J. Ackerman, K. Coleman, R. E. Tarone and J. H. Robbins, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 22355–22362.
- 61 I. Kuraoka, P. Robins, C. Masutani, F. Hanaoka, D. Gasparutto, J. Cadet, R. D. Wood and T. Lindahl, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 49283–49288.
- 62 C. Marietta, H. Gulam and P. J. Brooks, *DNA Repair*, 2002, **1**, 967–975.
- 63 M. D'Errico, E. Parlanti, M. Teson, B. M. Bernardes de Jesus, P. Degan, A. Calcagnile, P. Jaruga, M. Björås, M. Crescenzi, A. Pedrini, J. M. Egly, G. Zambruno, M. Stefanini, M. Dizdaroglu and E. Dogliotti, *EMBO J.*, 2006, **25**, 4305–4315.
- 64 H. Rodriguez, P. Jaruga, D. Leber, S. G. Nyaga, M. K. Evans and M. Dizdaroglu, *Biochemistry*, 2007, **46**, 2488–2496.
- 65 J. B. Fiche, J. Fuchs, A. Buhot, R. Calemczuk and T. Livache, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 1049–1057.
- 66 V. Hegde, M. Wang and W. A. Deutsch, *DNA Repair*, 2004, **3**, 121–126.
- 67 G. Panayotou, T. Brown, T. Barlow, L. H. Pearl and R. Savva, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 45–50.



## SPR-imaging based assays on an oligonucleotide-array to analyze DNA lesions recognition and excision by repair proteins

Corne C.<sup>1, #</sup>, Fiche J.-B.<sup>2, #</sup>, Cunin V.<sup>3</sup>, Buhot A.<sup>2</sup>, Fuchs J.<sup>2</sup>, Calemczuk R.<sup>2</sup>, Favier A.<sup>1,3</sup>, Livache T.<sup>2</sup> and Gasparutto D.<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques, SCIB/UMR E3 CEA-UJF, INAC, CEA-Grenoble, F-38054 Grenoble Cedex 9, France.

<sup>2</sup> CREAB, SPrAM/UMR 5819 CEA-CNRS-UJF, INAC, CEA-Grenoble, F-38054 Grenoble Cedex 9, France.

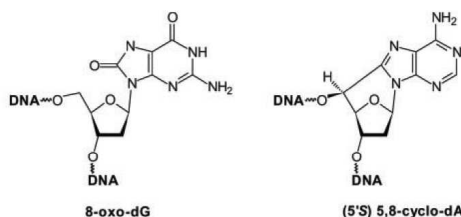
<sup>3</sup> Centre d'Investigation Biologique - CHU, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

### ABSTRACT

An original oligonucleotide-array, coupled with SPR-imaging detection, has been developed to study biological interactions between DNA base lesions and DNA repair enzymes. This bioanalytical tool constitutes an efficient screening platform to quantify DNA repair activities and to search for new DNA repair inhibitors.

### INTRODUCTION

Base excision repair (BER) is the major mechanism for correction of damaged nucleobases resulting of alkylation and oxidation to DNA (1,2). The first step in the BER pathway consists in excision of the abnormal base by several specific DNA *N*-glycosylases. A decrease in BER activity was found related to an increased risk in carcinogenesis and aging (3,4). Therefore, the correct functioning of DNA repair machinery is crucial for the maintenance of the genomic integrity and cell viability. To investigate BER activities we set up a new oligonucleotide-array for DNA repair analysis based on surface plasmon resonance imaging (SPRi). The latter label-free DNA sensorchip permits not only to detect *N*-glycosylase/AP-lyase activities, but also the binding of repair proteins to DNA damage without cleavage activity.



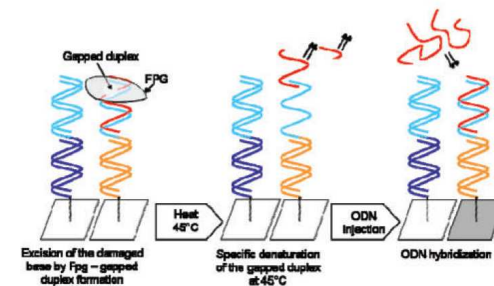
**Figure 1:** Structure of the damaged nucleosides site-specifically inserted into oligonucleotides and used in the SPRi-based enzymatic repair assays.

### RESULTS AND DISCUSSION

Modified oligonucleotides bearing an oxidatively generated base damage, namely 8-oxo-2'-deoxyguanosine

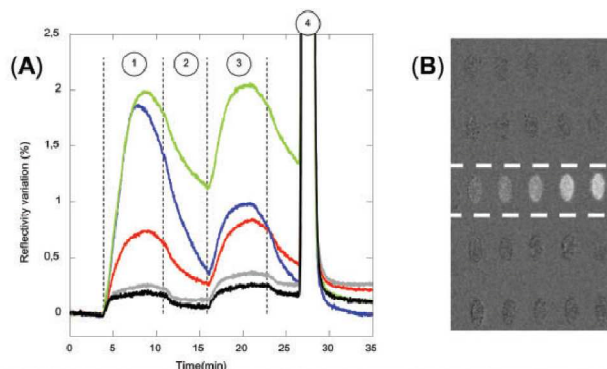
(8-oxo-dG) and (5'*S*) 5',8-cyclo-2'-deoxyadenosine (5',8-cyclo-dA) (Figure 1), were prepared by solid-phase chemical synthesis as previously described (5, 6). These damaged base-containing DNA fragments were hybridized with complementary strands grafted by a pyrrole electro-copolymerisation process on a glass prism coated with a gold layer (7). Then, the resulting lesion-containing oligonucleotide-array coupled with surface plasmon resonance imaging (SPRi) detection, was used to investigate the behavior of the *E. coli* Fapy DNA *N*-glycosylase protein (Fpg), a repair enzyme involved in the processing of oxidized nucleobases (8).

First, by using a thermal denaturation procedure followed by a specific hybridization step (Figure 2) the latter enzyme was shown as expected to bind and then cleave its natural substrate, namely 8-oxo-7,8-dihydroguanine, together with the resulting abasic site.



**Figure 2:** Fpg DNA repair activity can be observed using specific temperature denaturation. After 8-oxodG recognition, there is a reaction cascade including excision of the damaged nucleotide by Fpg. Two short strands (7-mer and 14-mer respectively) are formed which quickly denature at 45°C compared to the unmodified duplexes (22-mers). Consequently, after three minutes at 45°C, all the gapped duplexes dissociate and we observe specific hybridization by injecting the complementary sequence on the chip.

The use of the current DNA biochip also allows the observation of an original binding activity of Fpg protein towards the (5'*S*) 5',8-cyclo-2'-dAdenosine residue without



**Figure 3:** (A) Reflectivity data for Fpg/DNA interactions kinetics on the sensorchip for dsDNA without damage (red curve), 8-oxodG lesion (blue curve) and 5'(S)-CyclodA lesion (green curve). Black curve corresponds to poly-pyrrole control and the grey one to ssDNA spot. Curves are obtained as follows: after a first injection of Fpg at 50 nM and T=25°C during seven minutes (step 1), the chip surface is rinsed with the binding buffer (step 2). Then, another Fpg injection is performed in the same conditions (step 3) and, finally, surface is regenerated with a 1.5 M NaCl solution (4). (B) Image of the DNA chip as seen from the CCD. Due to SPR properties and the angle of incidence we used for the experiment, the gold appears darker than the spots. This picture is obtained by subtracting the image of the chip during the hybridization process with an image registered before injecting the targets. As a result, only the spot where hybridization occurs are revealed. The increase of intensity from left to right is correlated to an increase of the density of probes.

an additional AP-lyase activity (Figure 3). Such a behavior should have an important biological significance since the latter oxidative damage constitutes a possible endogenous inhibitor for Fpg protein and other DNA *N*-glycosylases that consequently decreases the cellular repair capacities. These results altogether show that the present oligonucleotide microarrays coupled with SPR imaging may be used to simultaneously and specifically detect recognition and excision steps of several DNA damages by repair enzymes (9).

## CONCLUSION

In the current work, we apply for the first time SPR-imaging to assess DNA *N*-glycosylase binding and catalytic properties toward various oxidatively damaged DNA sites. The present miniaturized label-free SPRI-based assay should provide a powerful tool to further substantiate the role of repair capacity in the development of cancer and human health. This technique should also be used as screening platforms to search for new DNA repair activity modulators, such as inhibitor drugs used in radio- and chemotherapy protocols.

**Acknowledgments:** The authors thank Dr. Serge Boiteux (DSV, CEA Fontenay-aux-Roses, France) for the kind gift of *E. coli* Fpg enzyme. The contribution of Christine Saint-Pierre (SCIB-INAC, CEA Grenoble) for MALDI-ToF mass spectrometry measurements of synthetic DNA probes is

gratefully acknowledged. We thank the Nanobio project (Grenoble, France) for financial support.

## REFERENCES

- David, S. S., Williams, S. D. (1998) *Chem. Rev.*, **98**, 1221-1262.
- Bjelland, S., Seeberg, E. (2003) *Mutat. Res.*, **531**, 37-80.
- David, S. S., O'Shea, V. L., Kundu, S. (2007) *Nature*, **447**, 941-950.
- Tudek, B. (2007) *Mol.Aspects of Med.*, **28**, 258-275.
- Bourdat, A.-G., Gasparutto, D., Cadet, J. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1015-1024.
- Romieu, A., Gasparutto, D., Molko, D., Cadet, J. (1998) *J. Org. Chem.*, **63**, 5245-5249.
- Livache, T., Roget, A., Dejean, E., Barthet, C., Bidan, G., Teoule, R. (1994) *Nucleic Acids Res.*, **22**, 2915-2921.
- Boiteux, S., O'Connor, T., Laval, J. (1987) *EMBO J.*, **6**, 3177-3183.
- Corne, C., Fiche, J.-B., Gasparutto, D., Cunin, V., Suraniti, E., Buhot, A., Fuchs, J., Calemczuk, R., Livache, T., Favier, A. (2008) *The Analyst (in press)*.

\* These authors contributed equally to this work

\*Corresponding Author. E-mail: didier.gasparutto@cea.fr. Tel: +33-(0)4-38-78-45-58. Fax: +33-(0)4-38-78-50-90.

## **A STUDY OF THE INTERACTIONS BETWEEN PROTEINS AND DNA DAMAGE USING SURFACE PLASMON RESONANCE IMAGING (SPRI)**

DNA is the carrier of genetic information. DNA damage caused by various physical or chemical stresses is a challenge for cellular repair systems. These include the base excision repair system (BER) which involves several enzymes whose objectives are the recognition and removal of damaged bases, well-recognised functions for two glycosylases: prokaryotic Fpg and eukaryotic OGG1. Many approaches have been described to study DNA/protein interactions *in vitro*. With surface plasmon resonance imaging (SPRI), we have a real-time technique, without labeling, with which we can observe interactions in parallel for a single protein purified enzyme (Fpg, OGG1, EndoIV or Ape1) vis-à-vis various injuries to synthetic oligonucleotides immobilized on a gold surface. The damages studied were an oxidized base (8-oxoG), a cyclised base (cycloadenine) and analogues of abasic sites (THF and C3). We also studied the action of these enzymes on multiple lesions, in tandem, combining the 8-oxoG and 8-oxoA bases on the same strand of DNA. The originality of our system combines the direct analysis of the DNA/protein interaction with the indirect approach of observing its outcome by hybridization and amplification of the signal after a thermal ramp. The results obtained enable us to consider the use of our technique to observe the simultaneous repair of certain lesions by cell extracts for biochemical work, or by human tissue extracts for bio-medical work.

Key-words : DNA-glycosylase Fpg, 8-oxoguanine, tandem lesions, Surface Plasmon Resonance imaging, DNA chip, Base Excision Repair.

## **ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE PROTEINES ET LESIONS DE L'ADN PAR RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE PAR IMAGERIE (SPRI)**

L'ADN étant le support de l'information génétique, les lésions de l'ADN provoquées par différents stress physiques ou chimiques sont un défi pour les systèmes de réparation cellulaire. Parmi ceux-ci le système de réparation par excision de bases (BER) implique plusieurs enzymes dont les objectifs sont la reconnaissance et le retrait de la base lésée, fonctions bien connues pour deux glycosylases : Fpg Procaryote et OGG1 Eucaryote. De nombreuses approches ont été décrites pour étudier les interactions ADN/protéine *in vitro*. Avec la résonance plasmonique de surface par imagerie (SPRI), nous disposons d'une technique d'analyse en temps réel, sans marquage avec laquelle nous avons pu observer des interactions parallélisées d'une même protéine enzymatique purifiée (Fpg, OGG1, EndoIV ou Ape1) vis-à-vis de différentes lésions sur des oligonucléotides de synthèse immobilisés sur une surface d'or. Les dommages étudiés sont une base oxydée (8-oxoG), une base cyclisée (cycloadénine) et des analogues de sites abasiques (THF et C3). Nous avons également étudié l'action de ces mêmes enzymes sur des lésions multiples, en tandem, associant les bases 8-oxoG et 8-oxoA sur le même brin d'ADN. L'originalité de notre dispositif associe l'analyse directe de l'interaction ADN/protéine et l'approche indirecte de sa conséquence par une stratégie d'hybridation et d'amplification du signal après une rampe thermique. Les résultats obtenus permettent d'envisager l'utilisation de notre technique pour observer la réparation simultanée de certaines lésions par des extraits cellulaires pour des travaux de biochimie ou des extraits tissulaires humains pour des travaux de biologie médicale.

Mots clés : ADN-glycosylase Fpg, 8-oxoguanine, lésions tandem, imagerie par résonance de plasmons de surface, puce à ADN, réparation par excision de base.